

## TENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents  
United States Patent and Trademark  
Office  
Box PCT  
Washington, D.C.20231  
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 16 September 1999 (16.09.99)	
International application No. PCT/SE98/02462	Applicant's or agent's file reference Pha-1798-PCT
International filing date (day/month/year) 30 December 1998 (30.12.98)	Priority date (day/month/year) 30 December 1997 (30.12.97)
Applicant MENDEL-HARTVIG, Ib et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:  
23 July 1999 (23.07.99)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Céline Faust

Telephone No.: (41-22) 338.83.38



## TENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING  
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

WIDÉN, Björn  
Pharmacia & Upjohn AB  
S-112 87 Stockholm  
SUÈDE

Date of mailing (day/month/year) 16 September 1999 (16.09.99)	<b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>
Applicant's or agent's file reference Pha-1798-PCT	
International application No. PCT/SE98/02462	International filing date (day/month/year) 30 December 1998 (30.12.98)

## 1. The following indications appeared on record concerning:

☐ the applicant    ☐ the inventor    ☒ the agent    ☐ the common representative

Name and Address WIDÉN, Björn Pharmacia & Upjohn AB Patent Dept. S-751 82 Uppsala Sweden	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No. 46 18 16 3000	
	Facsimile No. 46 18 12 6077	
	Teleprinter No.	

## 2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person    ☐ the name    ☒ the address    ☐ the nationality    ☐ the residence

Name and Address WIDÉN, Björn Pharmacia & Upjohn AB S-112 87 Stockholm Sweden	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No. 46 8 695 80 00	
	Facsimile No. 46 8 695 42 78	
	Teleprinter No.	

## 3. Further observations, if necessary:

## 4. A copy of this notification has been sent to:

<input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office	<input type="checkbox"/> the designated Offices concerned
<input type="checkbox"/> the International Searching Authority	<input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned
<input checked="" type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority	<input type="checkbox"/> other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer  Céline Faust
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38



1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/SE 98/02462

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC6: G01N 33/543, G01N 33/546, G01N 33/552

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC6: G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

SE,DK,FI,NO classes as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, EPODOC

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0217403 A2 (ABBOTT LABORATORIES), 8 April 1987 (08.04.87)  --	1-34
A	EP 0066648 A1 (FUJI PHOTO FILM CO., LTD.), 15 December 1982 (15.12.82), See esp. page 17 and page 28  --	1-34
A	EP 0422699 A2 (SYNTEX (U.S.A.) INC.), 17 April 1991 (17.04.91)  -- -----	1-34

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 March 1999

Date of mailing of the international search report

29 -03- 1999

Name and mailing address of the ISA.

Swedish Patent Office  
Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM  
Facsimile No. +46 8 666 02 86

Authorized officer

Hampus Rystedt  
Telephone No. +46 8 782 25 00

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

02/03/99

International application No.

PCT/SE 98/02462

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0217403 A2	08/04/87	SE 0217403 T3	
		AU 593285 B	08/02/90
		AU 613797 B	08/08/91
		AU 4170289 A	10/05/90
		AU 6350286 A	09/04/87
		CA 1281642 A	19/03/91
		CA 1301648 A	26/05/92
		DE 3686116 A	27/08/92
		DE 3687276 A	21/01/93
		EP 0389003 A,B	26/09/90
		SE 0389003 T3	
		GR 862328 A	19/01/87
		JP 1879967 C	21/10/94
		JP 2514878 B	10/07/96
		JP 5088785 B	24/12/93
		JP 5180841 A	23/07/93
		JP 6050973 A	25/02/94
		JP 62228167 A	07/10/87
		KR 9402520 B	25/03/94
		US 5008080 A	16/04/91
		US 5149622 A	22/09/92
		US 4916056 A	10/04/90
		US 5160701 A	03/11/92
EP 0066648 A1	15/12/82	JP 57200862 A	09/12/82
		US 4587102 A	06/05/86
EP 0422699 A2	17/04/91	AT 108555 T	15/07/94
		AU 596793 B	17/05/90
		AU 5362486 A	20/08/87
		CA 1283044 A	16/04/91
		DE 3681935 A	21/11/91
		DE 3689973 D,T	17/11/94
		DK 43492 A	31/03/92
		DK 70686 A	15/08/86
		DK 166846 B	19/07/93
		DK 167200 B	13/09/93
		EP 0191640 A,B	20/08/86
		SE 0191640 T3	
		FI 860675 A	15/08/86
		JP 2095891 C	02/10/96
		JP 8003488 B	17/01/96
		JP 61228354 A	11/10/86
		US 4740468 A	26/04/88
		US 4879215 A	07/11/89
		US 5716778 A	10/02/98

## PATENT COOPERATION TREATY

## PCT

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

REC'D 27 APR 2000

WIPO PCT

Applicant's or agent's file reference Pha-1798-PCT	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/SE98/02462	International filing date (day/month/year) 30.12.1998	Priority date (day/month/year) 30.12.1997
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC <sub>7</sub> G 01 N 33/543, G 01 N 33/546, G 01 N 33/552		
Applicant Pharmacia & Upjohn Diagnostics AB et al		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 3 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of \_\_\_\_\_ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand  23.07.1999	Date of completion of this report  03.04.2000
Name and mailing address of the IPEA/SE Patent- och registreringsverket Box 5055 S-102 42 STOCKHOLM Facsimile No. 08-667 72 88	Authorized officer  Hampus Rystedt/ELY Telephone No. 08-782 25 00

Form PCT/IPEA/409 (cover sheet) (January 1994)





# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/SE98/02462

## I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

☒ the international application as originally filed.

☐ the description, pages \_\_\_\_\_, as originally filed,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_, as originally filed,  
 Nos. \_\_\_\_\_, as amended under Article 19,  
 Nos. \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
 Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_, as originally filed,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

☐ the description, pages \_\_\_\_\_

☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_

☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/SE98/02462

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

Novelty (N)	Claims	<u>11, 17, 28, 34</u>	YES
	Claims	<u>1-10, 12-16, 18-27, 29-33</u>	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	<u>1-34</u>	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	<u>1-34</u>	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations

The present application relates to a method for detecting an analyte in a sample through biospecific binding of the analyte to a reactant bound to solid particles, and to an additional reactant, bound to analytically detectable particles. The detection is carried out in a porous matrix and the particles used are preferably smaller than the pores in the matrix.

The following document is considered particularly relevant:  
D1: US-A-5149622 (equivalent to EP-A2-217403, cited in the search report)

Through D1, a solid phase analytical device and method for using it is known. The device consists of a porous matrix having particles, smaller than the pores of the matrix, immobilized in it. A reagent capable of binding to the analyte is bound to the particles, see the abstract. The particles can be made of eg. polystyrene, see column 9 lines 10-15. The matrix is substantially lateral, see the abstract. A labeled reactant is added to the reaction in order to provide a visible result, see column 5-column 6 line 30. The label preferably produces a visually readable response, such as colouring, see column 7 line 48-column 8 line 9. Consequently, claims 1-10, 12-16, 18-27 and 29-33 of the present application lack novelty with regard to D1.

The predeposition of reactant in the matrix is a standard technique considered obvious to a person skilled in the art, as is the use of the method and device for diagnosing allergies or autoimmune diseases. Claims 11, 17, 28 and 34 are therefore considered to lack inventive step with respect to D1.



HOME COPY

PCT PO PCT

18 MAR 1999

04-03-1999

For receiving Office use only

International Application No. PCT/SE 98/02462

International Filing Date 30-12-1998

Name of receiving Office and PCT International Application  
The Swedish Patent Office  
PCT International ApplicationApplicant's or agent's file reference  
(if desired) (12 characters maximum) Pha-1798-PCT

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

## REQUEST

Record copy

## Box No. I TITLE OF INVENTION

Analytical method using particles and test kit for performing the method.

## Box No. II APPLICANT

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

Pharmacia & Upjohn Diagnostics AB  
SE-751 82 UPPSALA  
Sweden

☐ This person is also inventor.

Telephone No.  
+46 18 16 30 00

Facsimile No.  
+46 18 14 03 58

Teleprinter No.

State (that is, country) of nationality:  
SEState (that is, country) of residence:  
SE

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☒ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

## Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

Mendel-Hartvig, Ib  
Rabeniusvägen 28  
SE-756 55 UPPSALA  
Sweden

This person is:

☐ applicant only☒ applicant and inventor☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)State (that is, country) of nationality:  
SEState (that is, country) of residence:  
SE

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.

## Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:

☒ agent ☐ common representative

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

Widén, Björn both with the address:  
Svanström, Pär Pharmacia & Upjohn AB  
Patent Department  
SE-751 82 UPPSALA  
Sweden

Telephone No.  
+46 18 16 30 00

Facsimile No.  
+46 18 12 60 77

Teleprinter No.

☐ Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.

CORRECTED



## Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANTS AND/OR (FURTHER) INVENTORS

30-12-1998

*If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.*

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

Vinterbäck, Lena  
Gläntvägen 19A  
SE-757 56 UPPSALA  
Sweden

This person is:

- ☐ applicant only  
☒ applicant and inventor  
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:  
SE

State (that is, country) of residence:  
SE

This person is applicant  
for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

Jonsson, Ann  
Norrtäljegatan 5B  
SE-753 27 UPPSALA  
Sweden

This person is:

- ☐ applicant only  
☒ applicant and inventor  
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:  
SE

State (that is, country) of residence:  
SE

This person is applicant  
for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

Gustafsson, Jörgen  
Tunagatan 7D  
SE-753 37 UPPSALA  
Sweden

This person is:

- ☐ applicant only  
☒ applicant and inventor  
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:  
SE

State (that is, country) of residence:  
SE

This person is applicant  
for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

- ☐ applicant only  
☐ applicant and inventor  
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant  
for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

☐ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.





Box No.V DESIGNATION OF STATES

30-12-1998

The following designations are hereby made under Rule 4.9(a) (mark the applicable check-boxes; at least one must be marked):

## Regional Patent

- ☐ AP ARIPO Patent: GH Ghana, GM Gambia, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SZ Swaziland, UG Uganda, ZW Zimbabwe, and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT
- ☐ EA Eurasian Patent: AM Armenia, AZ Azerbaijan, BY Belarus, KG Kyrgyzstan, KZ Kazakhstan, MD Republic of Moldova, RU Russian Federation, TJ Tajikistan, TM Turkmenistan, and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT
- ☒ EP European Patent: AT Austria, BE Belgium, CH and LI Switzerland and Liechtenstein, CY Cyprus, DE Germany, DK Denmark, ES Spain, FI Finland, FR France, GB United Kingdom, GR Greece, IE Ireland, IT Italy, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Netherlands, PT Portugal, SE Sweden, and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT
- ☐ OA OAPI Patent: BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Central African Republic, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroon, GA Gabon, GN Guinea, ML Mali, MR Mauritania, NE Niger, SN Senegal, TD Chad, TG Togo, and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line)

## National Patent (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line):

- |   |   |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> AL Albania .....                               | <input type="checkbox"/> LS Lesotho .....                                   |
| <input type="checkbox"/> AM Armenia .....                               | <input type="checkbox"/> LT Lithuania .....                                 |
| <input type="checkbox"/> AT Austria .....                               | <input type="checkbox"/> LU Luxembourg .....                                |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australia .....                  | <input type="checkbox"/> LV Latvia .....                                    |
| <input type="checkbox"/> AZ Azerbaijan .....                            | <input type="checkbox"/> MD Republic of Moldova .....                       |
| <input type="checkbox"/> BA Bosnia and Herzegovina .....                | <input type="checkbox"/> MG Madagascar .....                                |
| <input type="checkbox"/> BB Barbados .....                              | <input type="checkbox"/> MK The former Yugoslav Republic of Macedonia ..... |
| <input type="checkbox"/> BG Bulgaria .....                              | <input type="checkbox"/> MN Mongolia .....                                  |
| <input type="checkbox"/> BR Brazil .....                                | <input type="checkbox"/> MW Malawi .....                                    |
| <input type="checkbox"/> BY Belarus .....                               | <input type="checkbox"/> MX Mexico .....                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Canada .....                     | <input type="checkbox"/> NO Norway .....                                    |
| <input type="checkbox"/> CH and LI Switzerland and Liechtenstein .....  | <input type="checkbox"/> NZ New Zealand .....                               |
| <input type="checkbox"/> CN China .....                                 | <input type="checkbox"/> PL Poland .....                                    |
| <input type="checkbox"/> CU Cuba .....                                  | <input type="checkbox"/> PT Portugal .....                                  |
| <input type="checkbox"/> CZ Czech Republic .....                        | <input type="checkbox"/> RO Romania .....                                   |
| <input type="checkbox"/> DE Germany .....                               | <input type="checkbox"/> RU Russian Federation .....                        |
| <input type="checkbox"/> DK Denmark .....                               | <input type="checkbox"/> SD Sudan .....                                     |
| <input type="checkbox"/> EE Estonia .....                               | <input type="checkbox"/> SE Sweden .....                                    |
| <input type="checkbox"/> ES Spain .....                                 | <input type="checkbox"/> SG Singapore .....                                 |
| <input type="checkbox"/> FI Finland .....                               | <input type="checkbox"/> SI Slovenia .....                                  |
| <input type="checkbox"/> GB United Kingdom .....                        | <input type="checkbox"/> SK Slovakia .....                                  |
| <input type="checkbox"/> GE Georgia .....                               | <input type="checkbox"/> SL Sierra Leone .....                              |
| <input type="checkbox"/> GH Ghana .....                                 | <input type="checkbox"/> TJ Tajikistan .....                                |
| <input type="checkbox"/> GM Gambia .....                                | <input type="checkbox"/> TM Turkmenistan .....                              |
| <input checked="" type="checkbox"/> GW Guinea-Bissau .....              | <input type="checkbox"/> TR Turkey .....                                    |
| <input type="checkbox"/> HR Croatia .....                               | <input type="checkbox"/> TT Trinidad and Tobago .....                       |
| <input type="checkbox"/> HU Hungary .....                               | <input type="checkbox"/> UA Ukraine .....                                   |
| <input type="checkbox"/> ID Indonesia .....                             | <input type="checkbox"/> UG Uganda .....                                    |
| <input type="checkbox"/> IL Israel .....                                | <input checked="" type="checkbox"/> US United States of America .....       |
| <input type="checkbox"/> IS Iceland .....                               | <input type="checkbox"/> UZ Uzbekistan .....                                |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan .....                      | <input type="checkbox"/> VN Viet Nam .....                                  |
| <input type="checkbox"/> KE Kenya .....                                 | <input type="checkbox"/> YU Yugoslavia .....                                |
| <input type="checkbox"/> KG Kyrgyzstan .....                            | <input type="checkbox"/> ZW Zimbabwe .....                                  |
| <input type="checkbox"/> KP Democratic People's Republic of Korea ..... |   |
| <input type="checkbox"/> KR Republic of Korea .....                     |   |
| <input type="checkbox"/> KZ Kazakhstan .....                            |   |
| <input type="checkbox"/> LC Saint Lucia .....                           |   |
| <input type="checkbox"/> LK Sri Lanka .....                             |   |
| <input type="checkbox"/> LR Liberia .....                               |   |

Check-boxes reserved for designating States (for the purposes of a national patent) which have become party to the PCT after issuance of this sheet:

**Precautionary Designation Statement:** In addition to the designations made above, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all other designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) indicated in the Supplemental Box as being excluded from the scope of this statement. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit. (Confirmation of a designation consists of the filing of a notice specifying that designation and the payment of the designation and confirmation fees. Confirmation must reach the receiving Office within the 15-month time limit.)



**PCT**WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION  
International Bureau

## INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

<b>(51) International Patent Classification <sup>6</sup> :</b> <b>G01N 33/543, 33/546, 33/552</b>	<b>A1</b>	<b>(11) International Publication Number:</b> <b>WO 99/36780</b> <b>(43) International Publication Date:</b> 22 July 1999 (22.07.99)
<b>(21) International Application Number:</b> PCT/SE98/02462 <b>(22) International Filing Date:</b> 30 December 1998 (30.12.98)  <b>(30) Priority Data:</b> 9704935-7 30 December 1997 (30.12.97) SE  <b>(71) Applicant (for all designated States except US):</b> PHARMACIA & UPJOHN DIAGNOSTICS AB [SE/SE]; S-751 82 Uppsala (SE).  <b>(72) Inventors; and</b> <b>(75) Inventors/Applicants (for US only):</b> MENDEL-HARTVIG, Ib [SE/SE]; Rabeniusvägen 28, S-756 55 Uppsala (SE). VINTERBACK, Lena [SE/SE]; Gläntvägen 19 A, S-757 56 Uppsala (SE). JONSSON, Ann [SE/SE]; Norrtäljegatan 5 B, S-753 27 Uppsala (SE). GUSTAFSSON, Jörgen [SE/SE]; Tunagatan 7 D, S-753 37 Uppsala (SE).  <b>(74) Agents:</b> WIDÉN, Björn et al.; Pharmacia & Upjohn AB, Patent Dept., S-751 82 Uppsala (SE).		<b>(81) Designated States:</b> AU, CA, JP, US, European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Published</b> <i>With international search report.</i> <i>In English translation (filed in Swedish).</i>
<b>(54) Title:</b> ANALYTICAL METHOD USING PARTICLES AND TEST KIT FOR PERFORMING THE METHOD  <b>(57) Abstract</b>  A method in and a kit for analytical methods in a flow matrix, which methods utilize biospecific affinity reactions to detect an analyte in a sample. The method and kit, respectively, are based on allowing the sample (analyte) and an analytically detectable reactant (Reactant*) to migrate through flow channels in a flow matrix to a detection zone (DZ) located in the matrix, in which zone there is a firmly anchored biospecific affinity reactant (Capturer), the Reactant* being captured in the detection zone (DZ) in an amount related to the amount of analyte in the sample. The method and kit are characterized in that A) Reactant* has particles as analytically detectable group, and B) the Capturer is anchored to the matrix via immobilized particles, which preferably are smaller than the smallest inner dimension of the flow channels and which preferably on their surface exhibit hydrophilic groups.		

**FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY**

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AL	Albania	ES	Spain	LS	Lesotho	SI	Slovenia
AM	Armenia	FI	Finland	LT	Lithuania	SK	Slovakia
AT	Austria	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabon	LV	Latvia	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaijan	GB	United Kingdom	MC	Monaco	TD	Chad
BA	Bosnia and Herzegovina	GE	Georgia	MD	Republic of Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tajikistan
BE	Belgium	GN	Guinea	MK	The former Yugoslav Republic of Macedonia	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Greece	ML	Mali	TR	Turkey
BG	Bulgaria	HU	Hungary	MN	Mongolia	TT	Trinidad and Tobago
BJ	Benin	IE	Ireland	MR	Mauritania	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Iceland	MX	Mexico	US	United States of America
CA	Canada	IT	Italy	NE	Niger	UZ	Uzbekistan
CF	Central African Republic	JP	Japan	NL	Netherlands	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norway	YU	Yugoslavia
CH	Switzerland	KG	Kyrgyzstan	NZ	New Zealand	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Democratic People's Republic of Korea	PL	Poland		
CM	Cameroon	KR	Republic of Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kazakstan	RO	Romania		
CU	Cuba	LC	Saint Lucia	RU	Russian Federation		
CZ	Czech Republic	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Germany	LK	Sri Lanka	SE	Sweden		
DK	Denmark	LR	Liberia	SG	Singapore		
EE	Estonia						

ANALYTICAL METHOD USING PARTICLES AND TEST KIT FOR  
PERFORMING THE METHOD

Technical field

5 The invention relates to determination methods utilizing  
biospecific affinity reactions in combination with an  
analytically detectable reactant (Reactant\*) to determine  
an analyte in a sample. The methods involve utilizing  
matrices surrounding a liquid flow, which transports  
10 analyte and reactants to a detection zone (DZ) in/on the  
matrix. In the detection zone there is a biospecific  
affinity reactant (Capturer) firmly anchored to the matrix,  
which allows for a complex (containing Reactant\* and the  
Capturer) to be formed in the detection zone in an amount  
15 reflecting the amount of analyte in the sample. the  
invention also relates to a test kit for performing the  
method.

By reactants (including the analyte), exhibiting  
20 biospecific affinity (bioaffinity reactants) and which  
therefore may be utilized in the invention, are meant  
individual members of the reactant pairs: antigen/hapten -  
antibody; biotin-avidin/streptavidin; two complementary  
single chains of nucleic acid etc. As antibodies, antigen  
25 binding antibody fragments such as Fab, F(ab)<sub>2</sub>, single  
chain Fv (scFv) antibodies etc. are considered. Relevant  
reactants do not have to be naturally occurring but may  
also be synthetically prepared molecules/binders.

30 The type of test methodology in question has previously  
been used primarily for biospecific affinity reactants  
where at least one part in a utilized reactant pair has  
exhibited protein structure, in particular in connection  
with so called immunochemical determination methods.

35 The biospecific affinity reactions are primarily performed  
in aqueous media (e.g. water).

**Previously used technique**

It is previously known how to anchor Capturer to the relevant type of matrices. An alternative has been to achieve this via particles, which have been deposited in/on the matrix. The Capturer has in turn been bound to the particles via bonds which are stable under the conditions used to capture a Reactant\* in the detection zone. The bond between Capturer and particle has commonly been covalent but also physical and biospecific adsorption may have been utilized. See inter alia Abbott/Syntex US 4,740,468; Abbott EP 472,476; Hybritech EP 437,287 and EP 200,381; Grace & Co. EP 420,053; Fuji Photo Film US 4,657,739; Boehringer Mannheim WO 94/06012. Label groups suitable to utilize for Reactant\* in the relevant type of tests are well known, e.g. particles (Pharmacia AB WO 96/22532; Unilever WO 88/08534; Abbott Laboratories US 5,120,643, Becton Dickinson EP 284,232 etc.). The combination of particles as detectable group and as anchoring particles is also known from several of the publications mentioned above. See e.g. Boehringer Mannheim EP 462,376.

**Disadvantages of previous technique and aim of the invention**

In connection with previously known determination methods of the type initially mentioned, there has often been a need for improved detection sensitivity. There has also often been desirable with systems which are easier to produce.

The invention aims at improvements concerning these problems.

**The invention**

We have now discovered that anchoring of the Capturer via particles, preferably being smaller than the smallest inner dimension of the flow channels in a flow matrix, is working

surprisingly well together with Reactant\*, in which the analytically indicatable group is particles. Thus the invention is a test methodology according to what initially has been said and is characterized in that:

- 5
- A) The analytically detectable reactant (Reactant\*) as label group has particles, and
  - B) The Capturer is anchored to the matrix via particles, having such dimensions that they as such could be
- 10 transported in the flow passing through the matrix.

The particles should, especially when they are smaller than the flow channels in the matrix, on their surface preferably exhibit hydrophilic groups, which do not belong

15 to the biospecific affinity reactant bound to the particles. Preferred hydrophilic groups are uncharged (usually in the form of alcoholic hydroxyl groups).

In principle, the label particles and anchoring particles

20 may be of the same type, only observing that the anchoring particles do not interfere with the detection of Reactant\* in the detection zone.

Particles, intended for anchoring of Capturer in DZ,

25 should, as mentioned above, preferably be smaller than the smallest inner dimension of the flow channels. Suitable particle sizes (largest outer dimension/diameters) are in the interval 0.1-1000  $\mu\text{m}$ , preferably 0.1-100  $\mu\text{m}$ .

Considerations must be made in every special case regarding

30 the smallest inner dimension of the flow channels in the matrix to be used. The particles used may be polydisperse or monodisperse. Their shape may vary from spherical to totally irregular. Suitable particle materials which can be mentioned are e.g.  $\text{SiO}_2$  and other polymeric materials such

35 as organic polymers chosen among

(a) synthetic polymers, e.g. condensation polymers, addition polymers etc. Among addition polymers can

particularly be mentioned those based on monomers  
chosen among alkylvinyl ether, arylvinyl ether,  
vinylarene (such as styrene and divinyl benzene),  
alkylalkene, acrylate, methacrylate, acrylamide,  
5 methacrylamide etc., and

(b) biopolymers, e.g. polysaccharides (agarose, dextran,  
starch) optionally being synthetically cross-linked (an  
example of semi-synthetic polymer) etc.

10

In this connection so called latex particles have often  
been used, which often are polymerized styrene or other  
polymerized alkene/alkadiene. The anchoring particles may  
be porous or non-porous.

15

It is often important to choose anchoring particles being  
intermediate regarding hydrophobic and hydrophilic  
features. The reason is that the flow matrices in question  
often exhibit a marked hydrophobicity although they are  
20 sufficiently hydrophilic for allowing a flow of aqueous  
liquid media. A marked hydrophobic particle, e.g. of  
polystyrene, is thus adsorbed very strongly to  
nitrocellulose membranes. The same can also be said for  
other flow matrices with comparable balance between  
25 hydrophilic and hydrophobic features. Unfortunately  
hydrophobic features of the particles promote non-specific  
adsorption of Reactant\* and/or analyte. This decreases the  
sensitivity of the test methodology. In our systems we  
therefore chose to hydrophilize hydrophobic particles, e.g.  
30 by on their surface introducing hydrophilic groups, such as  
hydroxy groups. It is particularly convenient to coat  
hydrophobic particles with polyhydroxy polymers or other  
hydrophilic polymers, which preferably should be  
substituted with hydrophobic groups, e.g. hydrocarbyl  
35 groups such as phenyl. As specific examples of usable  
hydrocarbyl substituted hydrophilic polymers, those having  
polysaccharide structure, e.g. phenyldextran can be  
mentioned. Presence of the hydrophobic groups on a



hydrophilic polymer facilitates the adsorption of the polymer to hydrophobic particles. This decreases in turn the need of stabilising an adsorbed polymer via cross-linking. In industrial engineering this may be of great importance as cross-linking easily leads to particle aggregation, especially for the particles having the small dimensions often used in connection with the present invention. Introduction of hydrophilic groups on the particles means that covalent binding of biospecific affinity reactants to the particles more easily can be achieved. Also hydrophilisation as such decreases the tendency of non-specific adsorption in the detection zone.

Particles intended for Reactant\* to be detectable are usually smaller than those utilized for anchoring. Suitable particle diameters are usually chosen in the interval 0.001-5  $\mu\text{m}$ , often preferably colloidal dimensions, so called sol (i.e. spheric and monodisperse with a size in the interval 0.001-1  $\mu\text{m}$ ). In principle the same particle material as for the anchoring particles may be used. Well known label particles are metal particles (e.g. gold sol), non-metal particles ( $\text{SiO}_2$ , carbon, latex (polystyrene) and killed erythrocytes and bacteria). For particles of non-colloidal dimensions it is true that they should be non-sedimentary under the conditions which are valid for transport in the matrix. Thus carbon particles (< 1  $\mu\text{m}$ ), which have been more or less irregular and more or less polydisperse, have been used (Pharmacia AB, WO 96/22532). The particles may be provided with groups facilitating their detection, e.g. by being provided with chromophore, fluorophore, radioactive compound, enzyme etc. In the invention it has been shown to be unexpectedly advantageous with fluorescent particles rather than coloured particles, such as carbon particles.

The demands for balance between hydrophobic and hydrophilic features for label particles are similar to those being true for the anchoring particles.

- 5 When the Capturer with its anchoring particles is deposited in the detection zone it is essential that the conditions are chosen so that physical adsorption to the matrix is promoted. Drying is often essential. When the bonds between matrix and anchoring particles once have been formed it is
- 10 often difficult to break them. However Reactant\* shall be applied under conditions promoting the reactant to be maintained in suspension and does not promote physical adsorption of the particles to the matrix. If Reactant\* is to be predeposited in the matrix it is essential that it is
- 15 made in a way which promotes rapid resuspension for transport in the matrix. Compare below under the heading "Application zone for biospecific affinity reactants other than analyte ( $A_RZ$ )".
- 20 In the detection zone, the analyte may bind directly or indirectly to the Capturer. In the last-mentioned case the Capturer is a biospecific affinity reactant which can bind to an additional reactant which in turn binds to the analyte via biospecific affinity. In this case this
- 25 additional reactant need not be immobilized in the matrix from the beginning, but may be movably (diffusively) predeposited in the matrix in an area or zone separated from the detection zone, or it may be added together with or separately from the sample. If this additional reactant is
- 30 in soluble form, the Capturer is advantageously one member of a specific binding pair, the other member of which is coupled or conjugated to the reactant. Examples of such specific binding pairs are immunological binding pairs, such as antigen-antibody and hapten-antibody, biotin-avidin
- 35 or -streptavidin, lectin-sugar, nucleic acid duplex.

The particle system according to the invention is particularly advantageous for allergy tests, where the

allergen with which the analyte (most often of IgE class) is to react usually is a complex mixture of up to 100 or even more different proteins. By covalent coupling of the proteins to particles and predeposition thereof, a very robustly immobilized allergen is obtained, which allergen in contrast to allergen which is passively adsorbed to a matrix does not leak selectively more of certain components. This in combination with the fact that particle labels give a very good signal results in an extraordinary test system for allergy. The above applies to all tests where complex binders are used, e.g. autoantigens in the determination of autoimmune disease.

A variant with soluble reactant (allergen) which is pre-deposited or is added together with the sample may also give other advantages in allergy tests, since on the one hand, the incubation time between particle label and allergen/analyte will be considerably longer, and, on the other hand, a soluble allergen is more available for reaction with the analyte than when the allergen is bound to a solid phase.

### Matrices

The matrix defines the space in which the reactants are transported. The matrix may be the inner surface of a single flow channel (e.g. a capillary), the inner surface of a porous matrix having a system of flow channels extending through, etc. This type of matrices is called flow matrices below. Flow matrices may exist in the form of monoliths, sheets, columns, membranes, single flow channels having capillary dimensions or aggregated systems of such flow channels etc. They may also exist in the form of particles packed in column casings, compressed fibres etc. The inner surface of the matrices should be hydrophilic, so that aqueous media (usually water) may be absorbed and transported through the matrices. The smallest inner dimension of the flow channels should be sufficiently large

for allowing transport through the matrix of the reactants used. The rule of thumb is that suitable matrices are selectable among those having flow channels with the smallest inner dimension in the interval 0.4-1000  $\mu\text{m}$ ,

5 preferably 0,4-100  $\mu\text{m}$  if the matrix has a system of mutually communicating flow channels. Flow channels having the smallest inner dimension in the upper part of the broad interval (up to 1000  $\mu\text{m}$ ) are primarily of interest for flow driven by an externally applied pressure/sucking.

10

Matrices of interest are often built up from a polymer, e.g. nitrocellulose, nylon etc. The material in the matrix as well as the physical and geometrical design of the flow channels may vary along the flow depending on what a  
15 certain part of the matrix is to be utilized for (Pharmacia AB WO 96/22532; Medix WO 94/15215).

Along the transport flow in the matrix there may be defined zones for application of sample ( $A_sZ$ ), reactants ( $A_rZ$ ),  
20 buffer ( $A_bZ$ ), etc. and zones for detection (DZ) and calibrator (CZ, see below).

Flow matrices, which may be used in the particular type of tests, are described in previous patent publications  
25 (Behringwerke US 4.861.711; Unilever WO 88/08534; Abbott US 5.120.643 and US 4.740.468; Becton Dickinson EP 284.232 and US 4.855.240; Pharmacia AB WO 96/22532 etc.).

### Transport flow

30 The direction of the transport flow is from an application zone towards a detection zone (DZ). Exactly which zones the transport flow will pass is determined by the particular test protocol. A transport flow may start from a point with radial spread and a flow front in the form of a circular  
35 periphery or a part thereof. A transport flow may also start from a zone in the form of a band and may have a straight flow front perpendicular to the direction of flow.

In a less preferred variant the transport flow proceeds from an application zone for sample, which at the same time is a zone for detection. The flow in this variant is spread  
5 out from the application/detection zone, preferably radially, and may possibly pass additional downstream detection zones.

The transport flow through the particular types of matrix  
10 may be achieved by influence of capillary forces, e.g. by starting off with a substantially dry matrix. As an aid a sucking body may be placed at the end of the flow. Flow, meaning transport mainly only of dissolved components, may be achieved if an electrical field is imposed across the  
15 matrix (in the flow direction).

The utilized flow is preferably lateral, i.e. parallel with the upper surface of the matrix. Also other types of flow (in depth in the matrix) may be used.  
20

#### **Relevant test protocols**

The invention may primarily be applied to non-competitive (non-inhibition) test variants but also to competitive (inhibition) test variants. The complexes being formed in  
25 different test protocols are described schematically below. It has been assumed that relevant reactants are monovalent regarding utilized binding sites. The protocols may be run as simultaneous or sequential variants regarding analyte and an added reactant. By simultaneous variants is meant  
30 that the analyte (sample) and the reactant in question migrate together at least during some part of the transport and preferably reach the detection zone simultaneously. By sequential variants is meant that the analyte (sample) at least during some part of the transport towards the  
35 detection zone migrates before a reactant and preferably reaches the detection zone before the reactant. The test protocols of the invention should always be simultaneous or sequential regarding analyte and Reactant\*. "-" relates to

firm anchoring from the start. "---" relates to binding via biospecific affinity.

A. Sandwich protocol:

- 5 Capturer and Reactant\* have biospecific affinity for the analyte. x is the number of moles of Capturer on the matrix. y is the number of moles of analyte (= the number of moles of Reactant\*), being bound to the Capturer.
- 10 Complex formed in the detection zone:
- Matrix(-Capturer)<sub>x</sub>.y(-Capturer---analyte---Reactant\*)<sub>y</sub>.

B. Sandwich protocol:

- The Capturer has biospecific affinity for Reactant I, which in turn has biospecific affinity for the analyte. Reactant\* has biospecific affinity for the analyte. x is the number of moles of Capturer on the matrix. y is the number of moles of analyte (= the number of moles of Reactant\*), being bound to the Capturer via Reactant I. y + z is the number of moles of Reactant I being bound to Capturer.
- 20

Complex formed in the detection zone:

Matrix(-Capturer)<sub>x-z-y</sub>(-Capturer---Reactant I)<sub>z</sub>(-Capturer---Reactant I---analyte---Reactant\*)<sub>y</sub>.

25

C. Inhibition protocol:

- The Capturer is an analyte analogue and has binding sites equivalent to binding sites on the analyte. Reactant II has biospecific affinity to the analyte and to Capturer.
- 30 Reactant\* has biospecific affinity to Reactant II. x is the number of moles of Capturer on the matrix. y is the number of moles of Reactant II (= the number of moles of Reactant\*), being bound to the matrix via Capturer.
- Reactant II is part of the complex in an amount related to the amount of analyte in the sample.
- 35

Complex formed in the detection zone:

Matrix(-Capturer)<sub>x-y</sub>(-Capturer---Reactant II---Reactant\*)<sub>y</sub>.

D. Inhibition protocol:

The Capturer exhibits biospecific affinity for both analyte and Reactant\*. Reactant\* is a detectable soluble analyte analogue. x and y are the number of moles of Reactant\* and analyte respectively, being bound to the matrix via Capturer. x + y is the number of moles of Capturer on the matrix.

Complex formed in the detection zone:

Matrix(-Capturer---Reactant\*)<sub>x</sub>(-Capturer---analyte)<sub>y</sub>.

**15 Application zone for sample (A<sub>s</sub>Z)**

This type of zone is to be found upstream of the detection zones for the intended analyte.

**20 Application zone for biospecific affinity reactants other than analyte (A<sub>r</sub>Z)**

The sequence of the application zones should ensure that the test protocols are simultaneous or sequential regarding analyte and Reactant\*. This means that the application zone for reactants (A<sub>r</sub>Z), inclusive for Reactant\* (A<sub>r</sub>.Z), should always be upstream of the detection zone. One or more reactants may be added in the same application zone. If the application zone is common to sample and at least one reactant (=A<sub>r</sub>Z/A<sub>s</sub>Z), e.g. Reactant\* (=A<sub>r</sub>.Z/A<sub>s</sub>Z), application may be performed simultaneously, e.g. that a sample and reactant are mixed before being applied in the zone. If desired the mixture may be pre-incubated so that the reactant binds in an intended way to the analyte or other components in the sample before application. One skilled in the art may with knowledge of different protocols easily determine which zones will be needed and in which order they are to be positioned.

Reactants being utilized in the method may be pre-deposited in the respective zone or be added when the determination method is performed. Pre-deposition means that the reactant in question is applied in advance and in such a way that it  
5 does not spread in the matrix until flow is initiated.

Pre-deposition of reactants may take place by methods known per se. (See e.g. Behringwerke US 4.861.711; Unilever WO 88/08534; Abbott US 5.120.643; Becton Dickinson EP  
10 284.232). It is important to take into consideration that the reactant in question should be able to dissolve when a liquid reaches a predeposited reactant. To ensure quick dissolution it is common to incorporate relevant reactants in substances being quickly dissolved by contact with the  
15 liquid medium used. This type of substances are often hydrophilic having polar and/or charged groups, such as hydroxy, carboxy, amino, sulphonate etc. In particular may be mentioned hydrophilic quickly soluble polymers, e.g. having carbohydrate structure, simple sugars including  
20 mono-, di- and oligosaccharides and corresponding sugar alcohols (mannitol, sorbitol etc.). It is common practice to first coat the relevant application zone with a layer of the quickly soluble substance, and then the reactant is applied, optionally followed by an additional layer of  
25 quickly soluble substance. An alternative way is to incorporate the reactant in particles of quickly soluble material which then are deposited in the relevant zone of the matrix.

### 30 Zones for buffer ( $A_pZ$ )

Essential buffer systems may be included in solutions added simultaneously with samples and reactants. In conventional technique addition of buffer takes place in the application zone upstream of the other application zones. This has  
35 usually been equal to sample application zone. In the present invention application of buffer may be performed in optional position (see below).



In a co-pending PCT application "Analytical method comprising addition in two or more positions and a device and test kit therefor" (based on SE 9704934-0) we describe an invention which in one variant provides a preferred  
5 embodiment of the present invention. The patent application is incorporated herein by reference. The invention in this separate patent application is based upon the discovery that liquid from two subsequent zones (AZ2 and AZ1) in a  
10 flow matrix may migrate after each other without being mixed, if liquid is applied to the downstream zone (AZ1) simultaneously or before applying liquid to the upstream zone. This has led to the possibility to achieve zonewise migration of optional reactants, included in the liquids, towards a detection zone. If the application zone for  
15 sample ( $A_sZ$ ) is placed downstream of the application zone for Reactant\* ( $A_rZ$ ), the test protocol becomes sequential regarding Reactant\*. Having an application zone only for liquid (buffer) ( $A_bZ$ ) between ( $A_rZ$ ) and ( $A_sZ$ ) a wash of the detection zone DZ is performed between capture of analyte  
20 and capture of Reactant\*. Such an intermediate buffer zone ( $A_bZ$ ) may also ensure that a reactant (including analyte), that is applied in a downstream zone, reaches DZ before a reactant, starting from an upstream application zone for liquid. The latter may be important if the matrix as such  
25 retards the reactant that has been applied in the downstream zone.

Reactants may be included in the liquid that is applied to a zone. Alternatively, they may be predeposited in the zone  
30 where the corresponding liquid is to be applied or in a zone positioned between this and the nearest downstream zone for application of liquid.

This separate invention allows for application of buffer in  
35 the present invention to be performed in optional position. According to conventional technique addition of buffer has only been possible in the application zone, upstream of the other application zones.

This embodiment of the invention is particularly interesting for methods being sequential regarding Reactant\*.

5

### Analytes

The invention is primarily adapted for determination of biospecific affinity reactants of the types initially mentioned. The analyte may be a cell or a virus or a part thereof. In particular antigen may be mentioned, such as an immunoglobulin or an antibody. For immunoglobulins the determination may relate to a certain Ig and/or a certain Ig subclass. For antibody the determination may relate to a certain specificity, optionally also the Ig class or Ig subclass of the antibody. Relevant Ig classes are IgA, IgD, IgE, IgG and IgM. Relevant Ig subclasses are IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4.

In sandwich variants (according to protocols A and B above) the analyte may be an antibody, directed to an allergen/antigen/hapten, and derive from a certain species, a certain Ig class or a certain Ig subclass. In this case Reactant\* may be an analytically detectable antibody directed to an epitope being specific for the species, Ig class or Ig subclass with Capturer (protocol A) and Reactant I (protocol B) as the allergen/antigen/hapten. Alternatively the reverse is chosen i.e. Capturer and Reactant I, respectively, is the antibody directed to the analyte. In the case where the analyte is an antigen in general, for protocol A both the Capturer and Reactant\* may be antibodies directed to the antigen. For protocol B it is Reactant I and Reactant\* that are antibodies directed to the antigen.

Competitive variants are the most interesting for low molecular analytes. Illustrative examples are antigen and hapten. For protocol C the Capturer may be the antigen or the hapten, firmly anchored to the matrix, Reactant II may

be an antibody, directed to the antigen, and Reactant\* may be an antibody directed to Reactant II. For protocol D the Capturer may be an antibody directed to the analyte and Reactant\* may be the analyte labelled with an analytically detectable group.

The method of the invention may be performed as part of diagnosing allergy or autoimmune disease.

It has been particularly interesting for the inventors to measure anti-allergen antibodies of IgE or IgG class, for the latter preferably with emphasis on some of the mentioned subclasses. Measurement of allergen-specific antibodies may be utilized in connection with diagnosing of IgE mediated allergy.

The invention has, as already mentioned above, proved to be particularly suitable in the case where the Capturer consists of a mixture of different components, e.g. allergen, which often consist of mixtures of several different allergenic components and where the analyte is antibodies directed to individual components in the mixture.

## **Samples**

Relevant samples may be of biological origin, e.g. from different body fluids (whole blood, serum, plasma, urine, tear fluid, cerebrospinal fluid etc.), from cell culture media, processing procedures in biotechnology, from food stuff, from the environment (environment analysis samples) etc. The samples may be pre-treated in order to fit e.g. the matrix, the test protocol involved etc.

## **Calibrators**

Determination methods of the type to which the invention relates involves measurement of the detectable signal from the analytically detectable reactant (Reactant\*) and the measured signal (sample value) is taken as a measure of the

amount of analyte in the sample. To transfer the measurement signal to actual amounts of analyte the signal is usually compared to the corresponding signal (calibrator value) of known standard amounts of analyte (calibrators).

- 5 In connection with the present invention a new calibrator system has been developed which applied to the present invention constitutes a best embodiment.

10 This separate invention means that the used calibrator in advance has been anchored to a matrix (matrix calibrator), preferably of the same type as the one utilized for sample run. When measuring the calibrator values matrix calibrator is allowed to bind to Reactant\* and then the measurement signal from Reactant\* is measured in a way known per se. By  
15 utilizing different amounts of matrix calibrator a series of calibrator values may be obtained corresponding to different pre-determined amounts of analyte in sample (standard amounts, dose response curve, calibration curve).

- 20 Instead of anchoring the calibrator in advance to the matrix, a reactant capable of binding the calibrator may be anchored and the calibrator is then added in connection with the determination of calibrator value. When a calibrator binder is bound to the matrix, the calibrator  
25 may either be movably (diffusively) pre-deposited in the matrix in a zone or area separated from the detection zone, or may be added together with or separately from the sample.

- 30 Applied to the present invention our new calibrator system primarily involves that the transport flow passes one or more zones with a calibrator firmly anchored to the matrix in the respective calibrator zone (KZ).

- 35 Anchoring of a calibrator or a calibrator binder to the matrix in a calibrator zone may be performed according to the same principles as for anchoring of Reactant I to a detection zone. The calibrator binder is usually one member

of a specific binding pair (reactant pair), the other member of the binding pair being coupled or conjugated to the calibrator substance. Examples of such specific binding pairs have been mentioned above in connection with the  
5 description of the Capturer.

Calibrator zones should be located downstream of the application zone for liquid, intended for transport of Reactant\*. In relation to the detection zone (DZ), the  
10 calibrator zone is preferably located upstream.

Our invention relating to calibrators is described in detail in our co-pending PCT application with the title "A method using a new calibrator and a device and test kit  
15 including the calibrator" (based on SE 9704933-2). This application is incorporated herein by reference.

#### **A second main aspect of the invention**

This aspect of the invention is a kit exhibiting (a) an  
20 analytically detectable biospecific affinity reactant (Reactant\*), in which the label group is particles, together with (b) a flow matrix having a detection zone in which a Capturer is firmly anchored via particles which preferably are smaller than the smallest inner dimension of  
25 the flow channels. Relevant particles and flow channels are according to what has been mentioned above. The flow matrix may exhibit application zones, pre-deposited reactants etc. according to the above.

30 The invention is illustrated in the experimental part and defined in the claims.

#### **EXAMPLE 1: COMPARISON BETWEEN BIRCH ALLERGEN BOUND VIA PARTICLES OR DIRECTLY ADSORBED TO THE DETECTION ZONE**

35

The example is based on determination of IgE specific to birch allergen. To show the strength of the invention the response obtained with a number of patient samples is

compared in a test variant where 1) the allergen extract has been coupled covalently to polystyrene particles coated with phenyldextran deposited in the detection zone with 2) allergen extract directly deposited and passively bound to a nitrocellulose membrane.

### Methods and materials

#### Adsorption of phenyldextran to polystyrene particles:

Phenyldextran (substitution degree: 1 phenyl group on each fifth monosaccharide unit = 20%, Mw dextran 40,000, Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden) dissolved in deionized water to various concentrations was adsorbed with stirring to polystyrene particles (0,49 µm, Bangs Laboratories): 1) 4-5 mg/ml, 8-10% particle suspension, RT 0,5 h; 2) 5 mg/ml, 5% particle suspension, RT, 1 h; 3) 20 mg/ml, 2% particle suspension, overnight. The particles were then washed twice in deionized water. The particle suspension was centrifuged between each incubation and wash (12,100 g, 30 minutes, Beckman J2-21).

Extraction of t3 (birch pollen, Betula verrucosa): 1 part (weight) of birch pollen (Allergon, Sweden) was extracted with 10 parts (volume) of 0,1 M of phosphate buffer, pH 7.4. The extraction was continued for 2 h on a shaker table (200 pulses/minute) at +4°C. The extract was centrifuged at 4000 rpm for 1,75 h. After filtration the t3-extract was applied to a PD-10 column (Pharmacia Biotech AB, Sweden) and eluted in 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8.5. The t3-eluate (designated: t3-extract 1/14) was taken to amino acid analysis for determination of the total level of protein.

Coupling of t3-extract to polystyrene particles (t3-particles): t3-extract was coupled to phenyldextran coated polystyrene particles with CDAP (1-cyano-4-dimethylamino-pyridinium bromide) (Kohn J and Wilchek M, FEBS Letters 154(1) (1983) 209-210).

Polystyrene particles (2128 mg) coated with phenyldextran in 30% (by volume) acetone, 2% particle suspension, were activated with 954 mg CDAP (100 mg/ml in 30% acetone) and 7.63 ml of 0,2 M triethylamine (TEA, Riedel-de Haen, Germany). CDAP was added with stirring and TEA was added dropwise for 90 seconds and stirring for a total of 120 s. The reaction was stopped by addition of 30% acetone (4 fold the volume) and centrifugation at 12,400 g for 35 minutes. The particles were washed once with deionized water.

10

640 ml of t3-extract 1/14 in 0,1 M  $\text{NaHCO}_3$ , pH 8.5, were added to the activated particles and the coupling reaction was performed for 1 h on a shaker table. The suspension was centrifuged and decanted before the particles were deactivated with 0.05 M aspartic acid and 0.05 M glutamic acid in 0.1 M  $\text{NaHCO}_3$ , pH 8.5. Incubation was effected on a shaker table overnight at +4°C. The particles were washed by centrifugation twice with 50 mM  $\text{NaPO}_4$ , 0.05%  $\text{NaN}_3$ , pH 7.4.

20

The concentration of particles was determined by a spectrophotometer at 600 nm with uncoated polystyrene particles as a reference. t3-coupled polystyrene particles were taken to amino acid analysis for determination of the total level of protein.

25

Deposition of t3-extract and t3-particles on membrane

(detection zone): To sheets of nitrocellulose with a polyester backing (Whatman, 8  $\mu\text{m}$ , width 5 cm) zones of t3-extract 1/14 were applied with Linear Stripper (IVEK Corporation) with a flow of 1  $\mu\text{l/s}$  and 1  $\mu\text{l/cm}$ . The t3-extract 1/14 was deposited undiluted and also diluted 1:1 in 0.1 M  $\text{NaHCO}_3$ , pH 8.5 (t3-extract 1/28). T3-particles were diluted to 4% particle level in 50 mM  $\text{NaPO}_4$ , 6% lactose, 0.05%  $\text{NaN}_3$ , pH 7.4.

35

Sheets with deposited material were dried for 1 hour at 30°C. The sheets were cut into strips with a width of 0.5 cm (Matrix 1201 Membrane Cutter, Kinematics Automation).

- 5 Carbon particle conjugate (Reactant\*): Monoclonal anti-human IgE antibody (anti-hIgE) was adsorbed to carbon particles (sp100, < 1 µm, Degussa, Germany) according to WO 96/22532. The final suspension diluted in test buffer contained 300 µg/ml carbon particles.

10

Test methodology: Strips were mounted on a surface inclined about 16° from the bench plane. Sucking membranes (width 3 cm, Whatman, 17 Chr) were placed 0.5 cm into the end of the strip. To obtain a constant pressure metal weights were put  
15 on the sucking membranes.

Samples and reagents were pipetted in the order below. Each sample and reagent volume was allowed to migrate into the membrane before the subsequent volume was pipetted.

20

- 1) 30 µl of test buffer (0.1 M Tris-HCl, 0.6 M NaCl, 10% sucrose, 3% bovine serum albumin, 0.05% bovine gammaglobulin, pH 7.4)
- 2) 30 µl serum sample
- 25 3) 20 µl of test buffer (the same as in step 1)
- 4) 20 µl of carbon particle conjugate (anti-hIgE antibody adsorbed to carbon particles, 300 µg/ml, diluted in test buffer)
- 5) 2 x 30 µl of test buffer
- 30 6) The carbon blackening of the detection zone was measured as absorbance with Ultrosan XL, Enhanced Laser Densiometer (LKB).



## RESULTS

## Amount of protein in the detection zone

Table 1 Deposited amount of t3 in the detection zone

5

Deposition solution/ suspension	Amount of protein in reaction zone per 0.5 cm strip (ng)
t3-extract 1/14	410
t3-extract 1/28	205
t3-coupled particles (4%)	226

Table 2

10 Lateral immuno-chromatography with (i) directly adsorbed t3-extract and (ii) t3-coupled particles in the detection zone. Uptake of t3 positive and negative serum samples, determined concerning concentration with Pharmacia CAP system (Pharmacia & Upjohn Diagnostics AB, Sweden).

Deposition solution/ suspension	35534 (1.8 KU/L)	35696 (3.1 KU/L)	35711 (29.4 KU/L)	36429 (neg, < 0.35 KU/L)
t3-extract 1/14	5*	6	3	0
t3-extract 1/28	5	0	0	0
4% t3-coupled particles	106	64	474	18

15

\* = Absorbance (x1000) in the reaction zone when the label has been bound.

### Conclusion

The experiments show that the same amount of birch allergen deposited in the form of coupled particles gives significantly higher binding of birch-specific IgE-  
5 antibodies as compared to when the allergen is deposited directly on the membrane.

In similar experiments different monodisperse polystyrene particles (Bangs Laboratories) were used as anchoring  
10 particles and instead of carbon particles, different diameters of fluorescent polystyrene were used. The diameters of the anchoring particles varied in the different experiments in the interval 0.28-3  $\mu\text{m}$ . The diameters of the label particles varied in the different  
15 experiments in the interval 0.1-0.5  $\mu\text{m}$ . The results followed generally the results for carbon particles as presented in detail above.

### 20 EXAMPLE 2: DETERMINATION OF BIRCH-SPECIFIC IgE WITH TEST VARIANT WHERE ALLERGENS HAVE BEEN PRE-DEPOSITED IN THE APPLICATION ZONE

#### Methods and materials

25 Biotinylation of birch pollen allergen: Extraction of t3 (birch pollen; Betula verrucosa) was performed as described previously except that the centrifuged and filtrated solution was applied to a PD-10 column and eluted into deionized water. The t3-eluate was freeze-dried (LSL  
30 SECROID, LYOLAB F, pump: LEYBOLD TRIVAC D8B).

Freeze-dried t3-material was dissolved in 0.15 M  $\text{KPO}_4$ , 0.15 M NaCl, pH 7.8. Determination of content was performed by aminoacid analysis. To the material was added  $^{125}\text{I}$ -labelled  
35 t3 and the mixture was applied to a PD-10 column equilibrated with 25 ml of 0.15 M  $\text{KPO}_4$ , 0.15 M NaCl, pH 7.8. Biotinylation of t3-allergen was carried out according to recommended conditions from the supplier (Pierce). To 3

mg of eluted t3-extract (2.0 ml) was then added 0.138 ml of biotin-LC-Sulfo-NHS (3.59 mM, Pierce), and incubation was performed on a shaker for 1 hour at room temperature. The coupling reaction was stopped by the addition of 50  $\mu$ L of 2 M glycine. The extract was then applied to a gel filtration column PD-10 equilibrated with 50 mM  $\text{NaPO}_4$ , 0.15 M NaCl, pH 7.4. Yields and final protein concentration were determined from the obtained radioactivity.

10 Coupling of streptavidin to polystyrene particles:

Streptavidin (Molecular Probes) was covalently coupled to phenyldextran-adsorbed polystyrene particles with CDAP (1-cyano-4-dimethylamino-pyridinium bromide) (Kohn J and Wilchek M, FEBS Letters 154(1) (1983) 209-210).

15 Desalting and buffer change of streptavidin was performed by gel filtration (PD-10) in  $\text{NaHCO}_3$ , 0.1 M, pH 8.5. 600 mg of phenyldextran-coated polystyrene particles in a 2 % solution in 30 % (by volume) acetone were activated by 4.5 ml of CDAP (0.44 M) and 3.6 ml of TEA (0.2 M triethylamine, Riedel-deHaën). CDAP was added with stirring for 60 seconds and TEA for 120 seconds. The particles were then washed with 30 % (by volume) acetone and centrifuged at 12,100 g (25 minutes, Beckman, J-21, JA-20, 10,000 rpm).

25 20.6 mg of streptavidin were coupled to 350 mg of activated particles with incubation on a shaker for 1.5 hours at +4°C. The particles were then centrifuged before deactivation was carried out with 0.05 M glutamic acid and 30 0.05 M aspartic acid in  $\text{NaHCO}_3$  buffer. Incubation was effected with stirring overnight at +4°C. The coupled particles were then washed twice with 50 mM  $\text{NaPO}_4$ , 0.05 %  $\text{NaN}_3$ , pH 7.4.

35 The particle concentration was determined spectrophotometrically at A 600 nm with untreated particles as reference.

Deposition of streptavidin-coupled particles on

nitrocellulose membranes: To sheets of nitrocellulose with a polyester backing (Whatman, 8  $\mu$ m, 5 cm width) zones of streptavidin-coupled particles diluted to 1 % particle content in 10 mM NaPO<sub>4</sub>, 5 % sucrose, 5 % dextran 5000, pH 7.4, were applied with a Linear Striper (IVEK Corporation).

The deposition flow was 2.5  $\mu$ l/cm and the rate 20 mm/sec.

- 10 The deposits were dried for 1 hour at 30°C, whereupon the sheets were cut to 0.5 cm wide strips (Matrix 1201 Membrane Cutter, Kinematics Automation).

Deposition of biotinylated allergen on filter paper: 10 x 5

- 15 mm filters were cut from filter papers (Whatman 3). 10  $\mu$ l of biotinylated t3 (77 ng) in 50 mM phosphate buffer, pH 7.4, BSA 6 %, were dispensed to the filters, and the filters were dried at 30°C for 45 minutes.

20 Coupling of anti-hIgE antibodies to detection particles:

- Antibodies to hIgE cleaved with pepsin to fab'2 fragments were coupled to fluorescent polystyrene particles having aldehyde groups on their surface (Molecular Probes C-17177 TransFluoSpheres, aldehyde-sulphate microspheres, 0.1  $\mu$ m, 633/720, 2 % solids). 23 mg of antibody were coupled to 66 mg of particles in 50 mM NaPO<sub>4</sub> buffer, pH 6, overnight at room temperature. Then 205  $\mu$ l of NaCNBH<sub>4</sub> (5 M) were added to reduce the coupling for 3 hours at room temperature. After centrifugation at 20,800 x g (50 minutes in Eppendorf 5417R, 14,000 rpm), deactivation was performed in 0.05 M glutamic acid and 0.05 M aspartic acid in deionized water, pH 6.5, overnight with stirring at room temperature. Centrifugation was then carried out at 20,800 x g (50 min). After blocking with 0.2 % BSA in 50 mM NaPO<sub>4</sub>, pH 7.4, with 0.05 % NaN<sub>3</sub> and incubation overnight at +4°C, centrifugation was performed again at 20,800 x g (50 min).

Washing twice with and storage in blocking buffer was then done. The particle concentration was determined in a fluorimeter (Perkin-Elmer LS50B) with a standard curve prepared with the original particle. Coupled protein  
5 concentration was determined by having radioactive anti-hIgE present during the coupling.

Test procedure: Strips were mounted to a surface inclined about 16° from the bench plane. Sucking membranes (3.5 cm  
10 width, Schleicher & Schuell, GB004) were placed 0.5 cm into the upper end of the strip. To obtain constant pressure, metal weights were placed on the sucking membranes. Samples and reagents were then pipetted successively as described below. Each sample and reagent volume was sucked into the  
15 membrane before the following volume was pipetted.

- 1) Prewash with 30 µl of 50 mM NaPO<sub>4</sub>, 0.15 M NaCl, pH 7.4.
- 2) A filter with predeposited biotinylated IgE was placed at the bottom of the strip.
- 20 3) 30 µl of serum were pipetted to each filter.
- 4) 20 µl of test buffer (0.1 NaPO<sub>4</sub>, 0.15 M NaCl, 10 % sucrose, 3 % BSA, 0.05 % bovine gammaglobulin, 0.05 % NaN<sub>3</sub>, pH 7.4) were added to the filter.
- 5) The allergen filter was removed.
- 25 6) 20 µl of detection conjugate (75 µg/ml) diluted in test buffer.
- 7) 2 x 30 µl of test buffer.
- 8) The fluorescence of the detection zone was measured as a response area (Vmm) with a scanning red laser fluorometer  
30 (635 nm).

Selected serum samples included negative, weakly positive and a high positive serum.

## Results

Sample	IgE conc. (KU/L)	Group	Response area (Vmm)
35517	0.7	weakly pos.	0.083
35713	0.8	weakly pos.	0.037
35803	0.9	weakly pos.	0.361
35805	1.1	weakly pos.	0.166
37692	neg.	neg.	0.001
35592	neg.	neg.	0.096
35593	neg.	neg.	0.006
35599	neg.	neg.	0.002
35716	54	pos.	2.507

- 5 The results show that the principle of predeposited allergens (or antigens) in the application zone and a general binder in the reaction zone functions well.

## CLAIMS

1. A method associated with analytical methods in a flow matrix, which methods utilize biospecific affinity reactions to detect an analyte in a sample, and which comprises:
  - i. allowing the sample (analyte) and an analytically detectable reactant (Reactant\*) migrate through flow channels in a flow matrix to a detection zone (DZ) located in the matrix, in which there is a firmly anchored biospecific affinity reactant (Capturer), wherein
  - ii. Reactant\* is captured in the detection zone (DZ) in an amount, being related to the amount of analyte in the sample,  
**characterized** in that
    - A) Reactant\* has particles as an analytically detectable group, and
    - B) the Capturer is anchored to the matrix via immobilized particles, which preferably exhibit hydrophilic groups on their surface.
2. The method according to claim 1, **characterized** in that the flow occurs laterally in the matrix.
3. The method according to claim 1 or 2, **characterized** in that the flow is driven by capillary forces.
4. The method according to any of the claims 1-3, **characterized** in that the Capturer is capable of binding via biospecific affinity a reactant which in turn binds analyte biospecifically.
5. The method according to claim 4, **characterized** in that said reactant is applied with the sample or is predeposited in the matrix upstream of the detection

zone (DZ) such that the reactant can react with analyte before reaching the detection zone (DZ).

6. The method according to any of claims 1-5,  
5 **characterized** in that the particles anchoring the Capturer have a size which is smaller than the smallest inner dimension of the flow channels of the matrix.
7. The method according to any of the claims 1-6,  
10 **characterized** in that the particles, which anchor the Capturer, have a size being in the range of 0.1-1000  $\mu\text{m}$ , preferably the range of 0.1-100  $\mu\text{m}$ .
8. The method according to any of the claims 1-7,  
15 **characterized** in that the label particles have a diameter in the range of 0.01-5  $\mu\text{m}$ .
9. The method according to any of the claims 1-8,  
20 **characterized** in that the flow channels have the smallest inner dimension in the range of 0.4-1000  $\mu\text{m}$ , preferably 0.4-100  $\mu\text{m}$ .
10. The method according to any of the claims 1-9,  
25 **characterized** in that the label particles are fluorescent or coloured.
11. The method according to any of the claims 1-10,  
30 **characterized** in that Reactant\* is predeposited in the matrix upstream of the detection zone (DZ) and preferably upstream of the sample application site.
12. The method according to any of the claims 1-11,  
35 **characterized** in that the particles, which anchor the Capturer to the matrix, are a synthetic polymer or a semisynthetic polymer or a biopolymer which on its surface exhibits hydrophilic groups.



13. The method according to any of the claims 1-12,  
**characterized** in that the determination method is of  
sandwich type in which Reactant\* is captured in the  
detection zone (DZ) by formation of the ternary complex  
Reactant'---analyte---Reactant\*, wherein Reactant' and  
Reactant\* are able to simultaneously bind analyte  
biospecifically and Reactant' is the firmly anchored  
Capturer or a reactant to which the Capturer may bind  
via biospecific affinity.
14. The method according to claim 13, **characterized** in that  
the analyte is an antibody with specificity for either  
Reactant' or Reactant\*, and that
- a) Reactant' is an antigen/hapten and Reactant\* is an  
antibody directed to a constant antibody region on  
the analyte, when the antibody specificity of the  
analyte is directed to Reactant', or
- b) Reactant\* is an antigen/hapten and Reactant' is an  
antibody directed to a constant antibody region on  
the analyte, when the antibody specificity of the  
analyte is directed to Reactant'.
15. The method according to claim 13, **characterized** in that  
the analyte is an antigen and Reactant' and Reactant\*  
are antibodies with specificity for epitopes on the  
analyte.
16. The method according to any of the claims 13-14,  
**characterized** in that the analyte is of IgE class  
directed to an allergen.
17. The method according to any one of the claims 1-16,  
**characterized** in that the determination method is

performed in connection with diagnosing allergy or autoimmune disease.

18. A test kit for performing analytical methods in a flow matrix, which methods utilize biospecific affinity reactions to detect an analyte in a sample, which kit comprises (i) a flow matrix having a detection zone (DZ), in which there is a firmly anchored biospecific affinity reactant (Capturer), and (ii) an analytically detectable reactant (Reactant\*),  
**characterized** in that
- A) Reactant\* has particles as an analytically detectable group, and
  - B) the Capturer is anchored to the matrix via immobilized particles, which preferably exhibit hydrophilic groups on their surface.
19. The kit according to claim 18, **characterized** in that the matrix is a lateral flow matrix.
20. The kit according to claim 18 or 19, **characterized** in that the flow in the matrix is driven by capillary forces.
21. The kit according to any of the claims 18-20, **characterized** in that the Capturer is capable of binding via biospecific affinity a reactant which in turn binds analyte biospecifically.
22. The kit according to claim 21, **characterized** in that said reactant is applied with the sample or is predeposited in the matrix upstream of the detection zone (DZ) such that the reactant can react with analyte before reaching the detection zone (DZ).
23. The kit according to any one of claims 18-22, **characterized** in that the particles anchoring the

Capturer have a size which is smaller than the smallest inner dimension of the flow channels of the matrix.

24. The kit according to any of the claims 18-23,  
5        **characterized** in that the particles, which anchor the  
      Capturer, have a size being in the range of 0.1-1000  
       $\mu\text{m}$ , preferably the range of 0.1-100  $\mu\text{m}$ .
25. The kit according to any of the claims 18-24,  
10        **characterized** in that the label particles have a  
      diameter in the range of 0.01-5  $\mu\text{m}$ .
26. The kit according to any of the claims 18-25,  
      **characterized** in that the flow channels have the  
15        smallest inner dimension in the range of 0.4-1000  $\mu\text{m}$ ,  
      preferably 0.4-100  $\mu\text{m}$ .
27. The kit according to any of the claims 18-26,  
      **characterized** in that the label particles are  
20        fluorescent or coloured.
28. The kit according to any of the claims 18-27,  
      **characterized** in that Reactant\* is predeposited in the  
      matrix upstream of the detection zone (DZ) and  
25        preferably upstream of the sample application site.
29. The kit according to any of the claims 18-28,  
      **characterized** in that the particles, which anchor the  
      Capturer to the matrix, are a synthetic polymer or a  
30        semisynthetic polymer or a biopolymer which on its  
      surface exhibits hydrophilic groups.
30. The kit according to any of the claims 18-29,  
      **characterized** in that the kit is intended for a  
35        determination method of sandwich type in which  
      Reactant\* is captured in the detection zone (DZ) by

formation of the ternary complex Reactant'---analyte---  
Reactant\*, wherein Reactant' and Reactant\* are able to  
simultaneously bind analyte biospecifically and  
Reactant' is the firmly anchored Capturer or a reactant  
to which the Capturer may bind via biospecific  
affinity.

31. The kit according to claim 30, **characterized** in that  
the analyte is an antibody with specificity for either  
Reactant' or Reactant\*, and that
- a) Reactant' is an antigen/hapten and Reactant\* is an  
antibody directed to a constant antibody region on  
the analyte, when the antibody specificity of the  
analyte is directed to Reactant', or
- b) Reactant\* is an antigen/hapten and Reactant' is an  
antibody directed to a constant antibody region on  
the analyte, when the antibody specificity of the  
analyte is directed to Reactant\*.
32. The kit according to claim 30, **characterized** in that  
the analyte is an antigen and Reactant' and Reactant\*  
are antibodies with a specificity for epitopes on the  
analyte.
33. The kit according to claim 30 or 31, **characterized** in  
that the analyte is of IgE class directed to an  
allergen.
34. The kit according to any of the claims 18-33,  
**characterized** in that the determination method is  
performed in connection with diagnosing allergy or  
autoimmune disease.

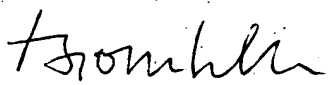
<b>Box N . VI PRIORITY CLAIM</b>					<input type="checkbox"/> Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.		
Filing date of earlier application (day/month/year)	Number of earlier application	Where earlier application is:					
		national application: country	regional application: regional Office	international application: receiving Office			
item (1) 30.12.1997 30 December 1997	9704935-7	SE					
item (2)							
item (3)							

☒ The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) (only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of the present international application is the receiving Office) identified above as item(s): (1)

\* Where the earlier application is an ARIPO application, it is mandatory to indicate in the Supplemental Box at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(ii)). See Supplemental Box.

<b>Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY</b>			
<b>Choice of International Searching Authority (ISA)</b> (if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used): ISA / SE	<b>Request to use results of earlier search; reference to that search</b> (if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority): Date (day/month/year)      Number      Country (or regional Office) 12 January 1998      SE 98/00067		

<b>Box No. VIII CHECK LIST; LANGUAGE OF FILING</b>	
This international application contains the following number of sheets: request : 4 ✓ description (excluding sequence listing part) : 23 ✓ claims : 6 ✓ abstract : 1 ✓ drawings : sequence listing part of description : Total number of sheets : 34 ✓	This international application is accompanied by the item(s) marked below: 1. <input checked="" type="checkbox"/> fee calculation sheet 2. <input type="checkbox"/> separate signed power of attorney 3. <input checked="" type="checkbox"/> copy of general power of attorney; reference number, if any: 295 4. <input type="checkbox"/> statement explaining lack of signature 5. <input type="checkbox"/> priority document(s) identified in Box No. VI as item(s): 6. <input type="checkbox"/> translation of international application into (language): 7. <input type="checkbox"/> separate indications concerning deposited microorganism or other biological material 8. <input type="checkbox"/> nucleotide and/or amino acid sequence listing in computer readable form 9. <input checked="" type="checkbox"/> other (specify): ITS SE 98/00067
Figure of the drawings which should accompany the abstract:	Language of filing of the international application: Swedish

<b>Box No. IX SIGNATURE OF APPLICANT OR AGENT</b>	
Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request). <div style="text-align: center; margin-top: 20px;">             Björn Widén         </div>	

For receiving Office use only	
1. Date of actual receipt of the purported international application: <div style="text-align: right; font-size: 1.2em;">30-12-1998</div>	2. Drawings: <input type="checkbox"/> received:  <input checked="" type="checkbox"/> not received:
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:	
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):	
5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA / SE	6. <input type="checkbox"/> Transmittal of search copy delayed until search fee is paid.

For International Bureau use only	
Date of receipt of the record copy by the International Bureau:	10 FEBRUARY 1999      ( 10.02.99 )



.

.

**ANALYSMETOD MED PARTIKLAR OCH TESTKIT FÖR UTFÖRANDE AV  
METODEN**

**Teknikområd**

- 5 Uppfinningen avser bestämningsmetoder som utnyttjar biospecifika affinitetsreaktioner i kombination med en analytiskt detekterbar reaktant (Reaktant\*) för att bestämma en analyt i ett prov. Metoderna innebär att man utnyttjar matriser som omger ett vätskeflöde vilket
- 10 transporterar analyt och reaktanter till en detektionszon (DZ) i/på matrisen. I detektionszonen finns en biospecifik affinitetsreaktant (Fångare) fast förankrad till matrisen, vilket möjliggör att det i detektionszonen kan bildas ett komplex (innehållande Reaktant\* och Fångaren) i en mängd
- 15 som återspeglar mängden analyt i provet. Uppfinningen avser även testkit för utförande av metoden.

- Med reaktanter (inklusive analyten), som uppvisar biospecifik affinitet (bioaffina reaktanter) och därmed kan utnyttjas i uppfinningen, avses enskilda medlemmar i
- 20 reaktantparen: antigen/hapten - antikropp; biotin-avidin/streptavidin; två komplementära enkelkedjor av nukleinsyra etc. Till antikroppar räknas antigen-bindande antikroppsfragment såsom Fab, F(ab)<sub>2</sub>', enkelkedje-Fv-(scFv)-antikroppar etc. Aktuella reaktanter behöver inte
- 25 vara naturligt förekommande utan kan även vara syntetiskt framställda molekyler/bindare.

- Den aktuella typen av testmetodik har tidigare främst utnyttjats för biospecifika affinitetsreaktanter där minst den ena i ett utnyttjat reaktantpar har uppvisat
- 30 proteinstruktur, speciellt i samband med så kallade immunkemiska bestämningsförfaranden.

Biospecifika affinitetsreaktionerna utförs främst i vattenhaltiga medier (exempelvis vatten).

35 **Tidigare utnyttjad teknik**

Det är tidigare känt hur man förankrar Fångare till den aktuella typen av matriser. Ett alternativ har varit att





göra detta via partiklar, som deponerats i/på matrisen. Fångaren har i sin tur varit bunden till partiklarna via bindningar, som är stabila under de betingelser som gäller för att fånga upp Reaktant\* i detektionszonen. Bindningen mellan Fångare och partikel har vanligen varit kovalent, men även fysikalisk och biospecifik adsorption kan ha utnyttjats. Se bland annat Abbott/Syntex US 4,740,468; Abbott EP 472,376; Hybritech EP 437,287 och EP 200,381; Grace & Co EP 420,053; Fuji Photo Film US 4,657,739; Boehringer Mannheim WO 94/06012. Markörgrupper som är lämpliga att utnyttja för Reaktant\* i den aktuella typen av tester är välkända, däribland partiklar (Pharmacia AB WO 96/22532; Unilever WO 88/08534; Abbott Laboratories US 5,120,643; Becton Dickinson EP 284,232 etc). Kombinationen partiklar som detekterbar grupp och som förankringspartiklar är också känd från flera av ovannämnda publikationer. Se exempelvis Boehringer Mannheim EP 462,376.

#### **Nackdelar med tidigare teknik och mål med uppfinningen**

Vid tidigare kända bestämningsmetoder av det inledningsvis nämnda slaget har det ofta funnits ett behov av förbättrad detektionskänslighet. Dessutom har det ofta varit önskvärt med system som är lättare att framställa.

Uppfinningen siktar mot förbättringar med avseende på dessa problemställningar.

#### **Uppfinningen**

Vi har nu upptäckt att förankring av Fångaren via partiklar, som företrädesvis är mindre än minsta innermått hos flödeskanalerna i en flödesmatris, fungerar överraskande bra tillsammans med Reaktant\*, i vilken den analytiskt indikerbara gruppen är partiklar. Uppfinningen är således en testmetodik enligt vad som sagts inledningsvis och kännetecknas av att:

- a) den analytiskt detekterbara reaktanten (Reaktant\*) har som markörgrupp partiklar, och
- b) Fångaren är förankrad till matrisen via partiklar, som företrädesvis har sådana dimensioner att de, som



sådana, skulle kunna transporteras i flödet som går genom matrisen.

Partiklarna skall, särskilt när de är mindre än flödeskanalerna i matrisen, gärna på sin yta uppvisa hydrofila grupper, som ej tillhör den till partiklarna bundna biospecifika affinitetsreaktanten. Föredragna hydrofila grupper är oladdade (vanligen i form av alkoholiska hydroxylgrupper).

I princip kan markörpartiklar och förankringspartiklar vara av samma slag, bara man tillser att förankringspartiklarna inte stör detektion av Reaktant\* i detektionszonen.

Partiklar, som är avsedda för förankring av Fångare i DZ, skall, som ovan nämnts, företrädesvis vara mindre än flödeskanalernas minsta innermått. Lämpliga partikelstorlekar (största yttermått/diametrar) ligger i intervallet 0,1-1000  $\mu\text{m}$ , med företräde för 0,1-100  $\mu\text{m}$ .

Hänsyn måste i varje speciellt fall tas till flödeskanalernas minsta innermått i den matris som används. Partiklarna som används kan vara polydispersa eller monodispersa. Deras form kan variera allt från sfäriska till helt oregelbundna. Bland lämpliga partikelmateriäl kan nämnas  $\text{SiO}_2$ , och andra polymera material såsom organiska polymerer valda bland

(a) syntetiska polymerer, exempelvis kondensationspolymerer, additionspolymerer etc. Bland additionspolymerer kan speciellt nämnas de som är baserade på monomerer valda bland alkylvinyleter, arylvinyleter, vinylaren (såsom styren och divinylbenzen), alkylalken, akrylat, metakrylat, akrylamid, metakrylamid etc, och

(b) biopolymerer exempelvis polysackarider (agaros, dextran, stärkelse) som eventuellt kan vara syntetiskt tvärbundna (exempel på semisyntetisk polymer) etc.

I sammanhanget har man ofta använt så kallade latexpartiklar som ofta är polymeriserad styren eller annan



polymeriserad alken/alkadien. Förankringspartiklarna kan vara porösa eller icke-porösa.

Det är ofta väsentligt att välja förankringspartiklar, som är intermediära med avseende på hydrofoba och hydrofila egenskaper. Orsaken är, att aktuella flödesmatriser ofta  
5 uppvisar en uttalad hydrofobicitet, trots att de är tillräckligt hydrofila för att tillåta flöde av vattenhaliga vätskemedier. En utpräglad hydrofob partikel, exempelvis av polystyren, adsorberas således mycket starkt  
10 till nitrocellulosamembran. Detsamma gäller även andra flödesmatriser med jämförbar balans mellan hydrofila och hydrofoba egenskaper. Tyvärr gynnar hydrofoba egenskaper hos partiklarna icke-specifik adsorption av Reaktant\* och/eller analyt. Detta sänker testmetodikens känslighet. I  
15 våra system har vi därför valt att hydrofilisera hydrofoba partiklar, exempelvis genom att på deras yta införa hydrofila grupper, såsom hydroxigrupper. Speciellt praktiskt är det att belägga hydrofoba partiklar med polyhydroxipolymerer eller andra hydrofila polymerer, vilka  
20 gärna skall vara substituerade med hydrofoba grupper, exempelvis hydrokarbylgrupper såsom fenyl. Som specifika exempel på användbara hydrokarbylsubstituerade hydrofila polymerer kan nämnas de som har polysackaridstruktur, exempelvis fenyl-dextran. Närvaro av hydrofoba grupperna på en  
25 hydrofil polymer underlättar polymerens adsorption till hydrofoba partiklar. Detta minskar i sin tur behovet av att stabilisera en adsorberad polymer via tvärbindning. Produktionstekniskt kan detta vara av stor betydelse, eftersom tvärbindning lätt leder till partikelaggregation,  
30 speciellt för partiklarna av de små dimensioner som ofta är aktuella i samband med föreliggande uppfinning. Införande av hydrofila grupper på partiklarna innebär att man lättare kan kovalent binda biospecifika affinitetsreaktanter till partiklarna. Hydrofilisering i sig minskar också tendensen  
35 till icke-specifik adsorption i detektionszonen.

Partiklar, som är avsedda att göra Reaktant\* detekterbar, är vanligen mindre än de som utnyttjats för förankring. Lämpliga partikeldiametrar är vanligen valda i intervallet



0,001-5  $\mu\text{m}$ , ofta med företräde för kolloidala dimensioner, s.k. sol (d.v.s. sfäriska och monodispersa med storlek i intervallet 0,001-1  $\mu\text{m}$ ). Samma partikelmateriäl som för förankringspartiklarna kan i princip användas. Väikända markörpartiklar är metallpartiklar (exempelvis guldsol), icke-metallpartiklar ( $\text{SiO}_2$ , kol, latex (polystyren) och avdödade erythrocyter och bakterier). För partiklar av icke-kolloidala dimensioner gäller att de skall vara icke-sedimenterbara under de betingelser som gäller för transport i matrisen. Sålunda har kolpartiklar (< 1  $\mu\text{m}$ ), som varit mer eller mindre oregelbundna och mer eller mindre polydispersa använts (Pharmacia AB, WO 96/22532). Partiklarna kan vara försedda med grupper som underlättar deras detektion, exempelvis genom att ha tillförts kromofor, fluorofor, radioaktiva förening, enzym, etc. I uppfinningen har det visat sig vara oväntat fördelaktigt med fluorescenta partiklar framför färgade partiklar, såsom kolpartiklar.

Kraven på balans mellan hydrofoba och hydrofila egenskaper för markörpartiklar är snarlika de som gäller för förankringspartiklarna.

När Fångaren med sina förankringspartiklar deponeras i detektionszonen är det väsentligt att betingelserna väljs så att fysikalisk adsorption till matrisen gynnas. Intorkning är ofta väsentlig. När bindningarna väl utbildats mellan matris och förankringspartiklar, är de ofta svåra att bryta. Reaktant\* skall däremot appliceras under betingelser som gynnar att reaktanten hålls i suspension och missgynnar fysikalisk adsorption av partiklarna till matrisen. Skall Reaktant\* vara fördeponerad i matrisen är det väsentligt att göra det på ett sätt som gynnar snabb återsuspendering för transport i matrisen. Jämför nedan under rubriken "Appliceringszon för biospecifika affinitetsreaktanter andra än analyt ( $A_RZ$ )".

I detektionszonen kan analyten binda direkt eller indirekt till Fångaren. I det sistnämnda fallet är Fångaren





en biospecifik affinitetsreaktant som kan binda till ytterligare en reaktant som i sin tur binder till analyten via biospecifik affinitet. I detta fall behöver denna ytterligare reaktant inte från början vara immobiliserad i matrisen utan kan antingen vara rörligt (diffunderbart) fördeponerad i matrisen i en area eller zon skild från detektionszonen, eller också kan den tillsättas tillsammans med eller separat från provet. Om den ytterligare reaktanten är i löslig form, är Fångaren med fördel den ena komponenten i ett specifikt bindningspar, vars andra komponent är kopplad eller konjugerad till reaktanten. Exempel på sådana specifika bindningspar är immunologiska bindningspar som antigen-antikropp och haptent-antikropp, biotin-avidin eller -streptavidin, lektin-socker, nukleinsyraduplex.

Partikelsystemet enligt uppfinningen är särskilt fördelaktigt för allergitester, där allergenet som analyten (oftast av IgE-klass) ska reagera med vanligtvis är en komplex blandning av upp till 100 eller ännu fler olika proteiner. Genom kovalent koppling av proteinerna till partiklar och fördeponering av dessa, erhålls ett mycket robust immobiliserat allergen, som till skillnad från allergen som får passivt adsorbera till en matris, ej läcker selektivt mer av vissa komponenter. Detta kombinerat med att partikelmarkörer ger en mycket god signal, resulterar i ett utomordentligt testsystem för allergi. Det ovannämnda gäller för alla tester där komplexa bindare används, t.ex. autoantigener vid bestämning av autoimmun sjukdom.

En variant med löslig reaktant (allergen) som är fördeponerad eller som tillförs med provet kan även ge andra fördelar vid allergitester, eftersom dels inkubationstiden mellan partikelmarkör och allergen/analyt blir betydligt längre och dels att lösligt allergen är mer tillgängligt för reaktion med analyten än när allergenet är bundet på fast fas.



**Matris r**

Matrisen definierar det rum i vilket reaktanterna transporteras. Matrisen kan vara den inre ytan av en enkel flödeskanal (exempelvis en kapillär), den inre ytan av en porös matris med genomgående system av flödeskanaler etc. Denna typ av matriser kallas fortsättningsvis flödesmatriser. Flödesmatriser kan vara i form av monoliter, ark, kolonner, membraner, enskilda flödeskanaler av kapillära dimensioner eller sammansatta system av dylika flödeskanaler etc. De kan även vara i form av partiklar som packats i kolonnhylsor, sammanpressade fibrer etc. Matrisernas inre yta bör vara hydrofil, så att vattenhaltiga medier (vanligen vatten) kan absorberas och transporteras genom matriserna. Flödeskanalernas minsta innermått skall vara tillräcklig stort för att tillåta transport genom matrisen av de reaktanter som används. Tumregeln är att lämpliga matriser finns att välja bland de som har flödeskanaler med minsta innermått i intervallet 0,4-1000  $\mu\text{m}$ , med företräde för 0,4-100  $\mu\text{m}$  om matrisen har ett system av sinsemellan kommunicerande flödeskanaler. Flödeskanaler med minsta innermått i den övre delen av det breda intervallet (upp till 1000  $\mu\text{m}$ ) är främst aktuella för flöde åstadkommet av externt pålagt tryck/sug.

Aktuella matriser är ofta uppbyggda av en polymer, exempelvis nitrocellulosa, nylon etc. Materialet i matrisen såväl som flödeskanalernas fysiska och geometriska utformning kan variera utefter flödet beroende på vad en viss del av matrisen skall utnyttjas till (Pharmacia AB WO 96/22532; Medix WO 94/15213).

I matrisen kan utefter transportflödet finnas definierade zoner för applicering av prov ( $A_pZ$ ), reaktanter ( $A_rZ$ ), buffert ( $A_bZ$ ), etc och zoner för detektion (DZ) och kalibrator (KZ, se nedan).

Flödesmatriser, som kan användas i den aktuella typen av tester finns beskrivna i tidigare patentpublikationer (Behringwerke US 4,861,711; Unilever WO 88/08534; Abbott US



5,120,643 och US 4,740,468; Becton Dickinson EP 284,232 och US 4,855,240; Pharmacia AB WO 96/22532 etc).

### Transportflöde

5 Transportflödets riktning är från en appliceringszon mot en detektionszon (DZ). Exakt vilka zoner transportflödet skall passera bestäms av aktuellt testprotokoll. Ett transportflöde kan starta från en punkt med radiell spridning och en flödesfront i form av en cirkelperiferi  
10 eller del därav. Ett transportflöde kan även starta från en zon i form av ett band och ha rak flödesfront vinkelrät mot flödesriktningen.

I en mindre föredragen variant utgår transportflödet från en appliceringszon för prov, som samtidigt är zon för  
15 detektion. Flödet sprids i denna variant ut från applicerings/detektionszonen, gärna radiellt, och passerar eventuellt ytterligare nedströms belägna detektionszoner.

Transportflöde genom de aktuella typerna av matris kan åstadkommas genom kapillärkrafterns inverkan, exempelvis  
20 genom att man startar med en i huvudsak torr matris. Som hjälp kan en sugande kropp vara placerad i slutändan av flödet. Flöde, som innebär transport i huvudsak av enbart lösta komponenter, kan åstadkommas om ett elektriskt fält appliceras över matrisen (i flödesriktningen).

25 Flödet som utnyttjas är helst lateralt, d.v.s. parallellt med matrisens ovanyta. Även andra typer av flöden (djupled i matrisen) går att använda.

### Aktuella testprotokoll

30 Uppfinningen kan främst appliceras på icke-kompetitiva (icke-inhibition) testvarianter, men även på kompetitiva (inhibition) testvarianter. Nedan ges schematiskt komplexen som bildas i några olika testprotokoll. Det har antagits att aktuella reaktanter är monovalenta med avseende på  
35 utnyttjade bindningsställen. Protokollen kan köras som simultana eller sekventiella varianter med avseende på analyt och en tillsatt reaktant. Med simultana varianter avses att analyten (provet) och reaktanten ifråga vandrar



tillsammans åtminstone under någon del av transporten och helst när detektionszonen samtidigt. Med sekventiella varianter avses att analyten (provet) åtminstone under någon del av transporten mot detektionszonen vandrar före en reaktant och helst när detektionszonen före reaktanten. Testprotokollen i uppfinningen skall alltid vara simultana eller sekventiella med avseende på analyt och Reaktant\*. "- " avser fast förankring från början. "---" avser bindning via biospecifik affinitet".

10

A. Sandwich-protokoll: Fångare och Reaktant\* har biospecifik affinitet mot analyten.  $x$  är antalet mol Fångare på matrisen.  $y$  är antal mol analyt (=antal mol Reaktant\*), som bundit till Fångaren.

15

Komplex bildat i detektionszonen:

$\text{Matris}(-\text{Fångare})_{x-y}(-\text{Fångare}---\text{analyt}---\text{Reaktant*})_y$ .

20

B. Sandwich-protokoll: Fångare har biospecifik affinitet mot Reaktant I, som i sin tur har biospecifik affinitet mot analyten. Reaktant\* har biospecifik affinitet mot analyten.  $x$  är antal mol Fångare på matrisen.  $y$  är antal mol analyt (= antal mol Reaktant\*), som bundit till Fångaren via Reaktant I.  $y+z$  är antal mol Reaktant I som bundit till Fångare.

25

Komplex bildat i detektionszonen:

$\text{Matris}(-\text{Fångare})_{x-z-y}(-\text{Fångare}---\text{Reaktant I})_z(-\text{Fångare}---\text{Reaktant I}---\text{analyt}---\text{Reaktant*})_y$ .

30

C. Inhibitionsprotokoll: Fångare är analytanalog och har bindningsställen som är ekvivalenta med bindningsställen på analyten. Reaktant II har biospecifik affinitet mot analyten och mot Fångare. Reaktant\* har biospecifik affinitet mot Reaktant II.  $x$  är antalet mol Fångare på matrisen.  $y$  är antalet mol Reaktant II (= antal mol Reaktant\*) som bundits till matrisen via Fångare. Reaktant II ingår komplexet i en mängd som är relaterad till mängden analyt i provet.

35





30-12-1998

Komplex bildat i detektionszonen:

Matris(-Fångare)<sub>x-y</sub>(-Fångare---Reaktant II---  
Reaktant\*)<sub>y</sub>.

- 5 **D. Inhibitionsprotokoll:** Fångaren uppvisar biospecifik affinitet mot både analyt och Reaktant\*. Reaktant\* är detekterbar analytanalog, som är löslig. x och y antal mol Reaktant\* respektive analyt, som bundit till matrisen via Fångare. x + y är antal mol Fångare på matrisen.

- 10 Komplex bildat i detektionszonen:

Matris(-Fångare---Reaktant\*)<sub>x</sub>(-Fångare---analyt)<sub>y</sub>

#### **Appliceringszon för prov (A<sub>p</sub>Z)**

- 15 Denna typ av zon skall finnas uppströms detektionszonen/-erna för avsedd analyt.

#### **Appliceringszon för biospecifika affinitetsreaktanter andra än analyt (A<sub>R</sub>Z)**

- 20 Appliceringszonernas sekvens skall säkerställa att testprotokollen blir simultana eller sekventiella med avseende på analyt och Reaktant\*. Detta innebär att appliceringszon för reaktanter (A<sub>R</sub>Z), inklusive för Reaktant\* (A<sub>R</sub>.Z), alltid skall ligga uppströms detektionszonen. En eller flera reaktanter kan tillsättas i samma appliceringszon. Om appliceringszonen är gemensam för prov och minst en reaktant (= A<sub>R</sub>Z/A<sub>p</sub>Z), exempelvis Reaktant\* (= A<sub>R</sub>.Z/A<sub>p</sub>Z), kan applicering ske samtidigt, t.ex. genom att prov och en reaktant blandas innan de appliceras i zonen. Vid behov kan blandningen förinkuberas så att reaktanten på avsett sätt binder till analyten eller andra komponenter i provet före applicering.
- 30 Fackmannen kan med kunskap om olika protokoll lätt bestämma vilka zoner han behöver och i vilken ordning de kan ligga.

- 35 Reaktanter som utnyttjas i metoden kan vara fördeponerade i sin respektive zon eller tillsättas i samband med att bestämningsmetoden utförs. Fördeponering innebär att



reaktanten ifråga applicerats i förväg och på sätt att den ej sprider sig i matrisen förrän flöde initierats.

Fördeponering av reaktanter kan ske på i och för sig känt sätt. Se till exempel (Behringwerke US 4,861,711; Unilever WO 88/08534; Abbott US 5,120,643; Becton Dickinson EP 284,232). Det är viktigt att man tar hänsyn till att reaktanten i fråga skall kunna gå i lösning när en vätska når fram till en fördeponerad reaktant. För att säkerställa snabb upplösning är det vanligt att inkorporera aktuella reaktanter i substanser, som snabbt löses upp vid kontakt med det vätskemedium som användes. Denna typ av substanser är ofta hydrofila med polära och/eller laddade grupper, såsom hydroxi, karboxi, amino, sulfonat etc. Speciellt kan nämnas hydrofila snabbblösliga polymerer, exempelvis med kolhydratstruktur, enkla socker inkluderande mono-, di- och oligosackarider och motsvarande sockeralkoholer (mannitol, sorbitol etc). Vanligt är att man först belägger den aktuella appliceringszonen med ett skikt av den snabbblösliga substansen, varefter reaktanten appliceras, eventuellt följt av ytterligare ett skikt snabbblöslig substans. Ett alternativt sätt är att inkorporera reaktanten i partiklar av snabbblösligt material som sedan deponeras i aktuell zon av matrisen.

#### 25 Zoner för buffert ( $A_B Z$ )

Nödvändiga buffertsystem kan ingå i lösningar som tillsätts samtidigt med prov och reaktanter. Enligt konventionell teknik sker tillsats av buffert i den appliceringszon som är belägen uppströms övriga appliceringszoner. Detta har vanligtvis varit detsamma som provpåsättningszon. I föreliggande uppfinning kan applicering av buffert ske i valfri position (se nedan).

I en parallellt inlämnad PCT-tansökan "Analysförfarande med tillsättning i två eller flera positioner och testkit och anordning för detta" (baserad på SE 9704934-0) beskriver vi en uppfinning, som i en variant ger en föredragen utförandeform av föreliggande uppfinning. Denna patentansökan inkorporeras härmed "by reference".



Uppfinningen i denna separata patentansökan baserar sig på upptäckten, att vätska från två efterföljande zoner (AZ2 och AZ1) i en flödesmatris kan vandra efter varandra utan att blanda sig, om man applicerar vätska till den nedströms

5 belägna zonen (AZ1) samtidigt eller innan man applicerar vätska till den uppströms belägna zonen. Detta har lett till att man kan uppnå zonvis vandring av eventuella reaktanter, som finns i vätskorna, mot en detektionszon.

Placeras appliceringszonen för prov ( $A_pZ$ ) nedströms

10 appliceringszonen för Reaktant\* ( $A_RZ$ ) blir testprotokollet sekventiellt med avseende på Reaktant\*. Har man en appliceringszon för enbart vätska (buffert) ( $A_bZ$ ) mellan  $A_RZ$  och  $A_pZ$  får man en tvätt av detektionszonen DZ mellan uppfångning av analyt och uppfångning av Reaktant\*. En

15 dylik mellanliggande buffertzona ( $A_bZ$ ) kan också säkerställa att en reaktant (inklusive analyt), som är applicerad i en nedströms belägen zon, når DZ före en reaktant, som startar från en uppströms belägen appliceringszon för vätska. Detta senare kan vara viktigt om matrisen i sig retarderar

20 reaktanten som applicerats i den nedströms belägna zonen.

Reaktanter kan ingå i den vätska som appliceras till en zon. Alternativt kan de vara fördeponerade i den zon som motsvarande vätska skall appliceras eller i en zon som ligger mellan denna och närmast nedströms liggande zon för

25 applicering av vätska.

Denna separata uppfinning möjliggör att applicering av buffert i föreliggande uppfinning kan ske i valfri position. Enligt konventionell teknik har tillsats av buffert endast varit möjlig i den appliceringszon som är

30 uppströms övriga appliceringszoner.

Denna utförandeform av uppfinningen är speciellt intressant för metoder som är sekventiella med avseende på Reaktant\*.



## Analyter

Uppfinningen är främst avpassad för att bestämma biospecifika affinitetsreaktanter av de inledningsvis nämnda slagen. Analyten kan vara en cell eller virus eller  
5 del av dessa. Speciellt kan nämnas antigen, såsom ett immunglobulin eller en antikropp. För immunglobuliner kan bestämningen avse en viss Ig- och/eller viss Ig-subklass. För antikropp kan bestämningen avse en viss specificitet, eventuellt även antikroppens Ig-klass eller Ig-subklass.  
10 Aktuella Ig-klasser är IgA, IgD, IgE, IgG och IgM. Aktuella Ig-subklasser är IgG1, IgG2, IgG3 och IgG4.

I sandwich-varianter (enligt protokoll A och B ovan) kan analyten vara en antikropp, som är riktad mot ett allergen/antigen/hapten, och härstamma från en viss art, viss Ig-  
15 klass eller viss Ig-subklass. I detta fall kan Reaktant\* vara en analytiskt detekterbar antikropp riktad mot en epitop som är specifik för arten, Ig-klassen eller Ig-subklassen med Fångare (protokoll A) och Reaktant I (protokoll B) som allergenet/antigenet/haptenet.  
20 Alternativt väljer man det omvända, d.v.s. Fångare respektive Reaktant I är antikroppen, som är riktad mot analyten. För det fall att analyten är ett antigen i allmänhet, kan för protokoll A både Fångare och Reaktant\* vara antikroppar, som är riktade mot antigenet. För  
25 protokoll B är det Reaktant I och Reaktant\* som är antikroppar riktade mot antigenet.

Kompetitiva varianter är mest intressanta för lågmolekylära analyter. Illustrativa exempel är antigen och hapten. För protokoll C kan Fångare vara antigenet eller  
30 haptenet, som är fast förankrat till matrisen, Reaktant II kan vara en antikropp, som är riktad mot antigenet, och Reaktant\* kan vara en antikropp, som är riktad mot Reaktant II. För protokoll D kan Fångare vara en antikropp riktad mot analyten och Reaktant\* kan vara analyten märkt med en  
35 analytiskt detekterbar grupp.

Uppfinningens metod kan utföras som en del i diagnostisering av allergi eller autoimmun sjukdom.





För uppfinnarna har det varit speciellt intressant att mäta anti-allergenantikroppar av IgE- eller IgG-klass, för de senare gärna med tonvikt på någon av de nämnda subklasserna. Mätning av allergen-specifika antikroppar kan utnyttjas i samband med diagnosticering av IgE-medierad allergi.

Uppfinningen har, som redan nämnts ovan, visat sig speciellt lämpad för fall där Fångaren består av en blandning olika komponenter, till exempel allergen, vilka ofta består av blandningar av ett stort antal olika allergena komponenter och där analyten är antikroppar riktade mot enskilda komponenter i blandningen.

#### Prover

Aktuella prover kan vara av biologiskt ursprung exempelvis från olika kroppsvätskor (helblod, serum, plasma, urin, tårvätska, cerebrospinalvätska etc), från cellodlingsmedier, upparbetningsförfaranden inom bioteknik, från livsmedel, från miljön (miljöanalysprover) etc. Proverna kan vara förbehandlade för att passa till exempelvis matrisen, testprotokollet som ingår etc.

#### Kalibratorer

Bestämningsmetoder av den typ som uppfinningen avser innebär att man mäter den påvisbara signalen från den analytiskt detekterbara reaktanten (Reaktant\*) och tar den uppmätta signalen (provvärde) som ett mått på mängden analyt i provet. För att överföra mätsignalen till verkliga mängder analyt jämförs signalen vanligen med motsvarande signal (kalibratorvärde) för kända standardmängder analyt (kalibratorer). I samband med föreliggande uppfinningen har man utvecklat ett nytt kalibratorsystem, vilket applicerat på denna uppfinning utgör en bästa utförandeform.

Denna separata uppfinning innebär, att den kalibrator som utnyttjas i förväg har förankrats till en matris (matriskalibrator), helst av samma slag som den som utnyttjas för provkörning. Vid upptagning av kalibratorvärden får matriskalibrator binda till Reaktant\*, varefter mätsignalen



från Reaktant\* mäts på i och för sig känt sätt. Genom att utnyttja olika mängder matriskalibrator kan man få en serie kalibratorvärden som svarar mot olika förutbestämda mängder analyt i prov (standardmängder, dos-responskurva, kalibreringskurva).

Istället för att i förväg förankra kalibratoren till matrisen kan man förankra en reaktant som har förmåga att binda kalibratoren och sedan tillsätta kalibratoren i samband med bestämningen av kalibratorvärde. När en kalibratorbindare är bunden till matrisen, kan kalibratoren antingen vara rörligt (diffunderbart) fördeponerad i matrisen i en zon eller area skild från detektionszonen, eller också kan den tillsättas tillsammans med eller separat från provet.

Applicerat på föreliggande uppfinning, innebär vårt nya kalibratorsystem främst att transportflödet passerar en eller flera zoner med en kalibrator, som är fast förankrad till matrisen i respektive kalibratorzon (KZ).

Förankring av en kalibrator eller kalibratorbindare till matrisen i en kalibratorzon kan ske enligt samma principer som gäller för att förankra Reaktant I till en detektionszon. Kalibratorbindaren är vanligtvis den ena komponenten i ett specifikt bindningspar (reaktantpar), varvid den andra komponenten i bindningsparet är kopplad eller konjugerad till kalibratorsubstansen. Exempel på sådana specifika bindningspar har nämnts ovan i samband med beskrivningen av Fångaren.

Kalibratorzoner skall vara belägna nedströms applicering-zon för vätska, som avser transport av Reaktant\*. I förhållande till detektionszon (DZ) ligger kalibratorzonen företrädesvis uppströms.

Vår uppfinning avseende kalibratorer finns utförligt beskriven i vår parallellt inlämnade PCT-ansökan med titeln "Metod som utnyttjar en ny kalibrator och anordning och testkit som innehåller kalibratoren" (baserad på SE 9704933-2). Denna ansökan inkorporeras härmed "by reference".



30-12-1998

**En andra huvudaspekt av uppfinningen**

Denna aspekt av uppfinningen är ett kit uppvisande (a) en analytiskt detekterbar biospecifik affinitetsreaktant (Reaktant\*), i vilken markörgruppen är partiklar, 5 tillsammans med (b) en flödesmatris, som har en detektionszon i vilken en Fångare är fast förankrad via partiklar, som företrädesvis är mindre än flödeskanalernas minsta innermått. Aktuella partiklar och flödeskanaler är enligt vad som sagts ovan. Flödesmatrisen kan uppvisa appliceringszoner, fördeponerade reaktanter etc enligt ovan. 10 Uppfinningen illustreras i den experimentella delen och definieras i patentkraven.

**EXEMPEL 1: JÄMFÖRELSE MELLAN BJÖRKALLERGEN SOM BUNDITS VIA PARTIKLAR ELLER SOM DIREKT-ADSORBERATS TILL DETEKTIONSZONEN** 15

Exemplet bygger på bestämning av IgE som är specifikt mot björkallergen. För att visa uppfinningens styrka, jämförs svaret man får på ett antal patientprover i en testvariant där 1) allergenextraktet kopplats kovalent till polystyrenpartiklar belagda med fenyl-dextran som deponeras i detektionszon med 2) allergenextrakt direkt deponerat och 20 passivt bundet till ett nitrocellulosamembran.

**Metoder och material**

25 Adsorption av fenyl-dextran till polystyrenpartiklar: Fenyl-dextran (substitutionsgrad: 1 fenylgrupp på var femte monosackaridenhet = 20%, Mw dextran 40.000, Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sverige) löst i avjonat vatten till olika koncentrationer adsorberades under omrörning till 30 polystyrenpartiklar (0,49 µm, Bangs Laboratories): 1) 4-5 mg/mL, 8-10 % partikelsuspension, RT 0,5 tim; 2) 5 mg/mL, 5 % partikelsuspension, RT, 1 timme; 3) 20 mg/mL, 2 % partikelsuspension, över natt. Partiklarna tvättades därefter 2 ggr i avjonat vatten. Partikelsuspensionen 35 centrifugerades mellan varje inkubering och tvätt (12.100 g, 30 minuter, Beckman J2-21).



Extraktion av t3 (björkpollen, Betula verrucosa): 1 del (vikt) björkpollen (Allergon, Sverige) extraherades med 10 delar (volym) 0,1 M fosfatbuffert, pH 7,4. Extraktionen pågick i 2 timmar på skakbord (200 impulser/minut) vid + 4°C.

5 Extraktet centrifugerades vid 4.000 rpm i 1,75 timmar. Efter filtrering applicerades t3-extraktet på en PD-10-kolonn (Amersham Pharmacia Biotech AB, Sverige) och eluerades ut i 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,5. t3-eluatet (benämnes: t3-extrakt 1/14) lämnades till aminosyraanalys för bestäm-

10 ning av den totala proteinhalten.

Koppling av t3-extrakt till polystyrenpartiklar (t3-partiklar): t3-extrakt kopplades till fenyl-dextranbelagda polystyrenpartiklar med CDAP (1-cyano-4-dimetylamino-

15 pyridinium-bromid) (Kohn J and Wilchek M, FEBS Letters 154(1) (1983) 209-210).

Polystyrenpartiklar (2128 mg) belagda med fenyl-dextran i 30 vol-% aceton, 2 % partikelsuspension, aktiverades med 954 mg CDAP (100 mg/mL i 30 % aceton) och 7,63 mL 0,2 M

20 trietylamin (TEA, Riedel-de Haen, Tyskland). CDAP tillfördes under omrörning, och TEA tillfördes dropptvis under 90 sekunder och omrörning i totalt 120 sekunder. Reaktionen avbröts genom tillsats av 30 % aceton (4 ggr volymen) och centrifugering vid 12.400 g i 35 min.

25 Partiklarna tvättades 1 gång med avjonat vatten.

640 mL t3-extrakt 1/14 i 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,5, tillfördes de aktiverade partiklarna och kopplingsreaktionen fick ske under 1 timme på skakbord. Suspensionen centrifugerades och dekanterades innan partiklarna

30 avaktiverades med 0,05 M asparaginsyra och 0,05 M glutaminsyra i 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,5. Inkubering på skakbord skedde över natt vid +4°C. Partiklarna tvättades genom centrifugering 2 ggr med 50 mM NaPO<sub>4</sub>, 0,05 % NaN<sub>3</sub>, pH 7,4.

Partikelkoncentrationen bestämdes spektrofotometriskt

35 vid 600 nm med obelagda polystyrenpartiklar som referens. t3-kopplade polystyrenpartiklar lämnades till aminosyraanalys för bestämning av den totala proteinhalten.





Deponering av t3-extrakt och t3-partiklar på membran (detektionszon): På flak av nitrocellulosa med polyesterbaksida (Whatman, 8 µm, 5 cm bred) applicerades zoner av t3-extrakt 1/14 med Linear Striper (IVEK Corporation) med flödet 1 µL/s och 1 µL/cm. t3-extraktet 1/14 deponerades ospätt samt spätt 1:1 i 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,5 (t3-extrakt 1/28). t3-partiklar späddes till 4 % partikelhalt i 50 mM NaPO<sub>4</sub>, 6 % laktos, 0,05 % NaN<sub>3</sub>, pH 7,4.

Flak med deponerat material torkades 1 timme vid 30°C. Flaken klipptes till 0,5 cm breda remsor (Matrix 1201 Membrane Cutter, Kinematics Automation).

Kolpartikelkonjugat (Reaktant\*): Monoklonal anti-human-IgE-antikropp (anti-hIgE) adsorberades till kolpartiklar (sp100, < 1 µm, Degussa, Tyskland) enligt WO 96/22532. Den färdiga suspensionen spädd i testbuffert innehöll 300 µg/mL kolpartiklar.

Testmetodik: Remsor monterades på en yta som lutade ca 16° från bänkplanet. Sugande membran (3 cm bred, Whatman, 17 Chr) placerades 0,5 cm in på remsans övre kant. För konstant tryck lades metalltyngder på de sugande membranen.

Prover och reagens pipetterades i ordning enligt nedan. Varje prov och reagensvolym fick vandra in i membranet innan nästföljande volym pipetterades.

1) 30 µL testbuffert (0,1 M tris-HCl, 0,6 M NaCl, 10 % sukros, 3 % bovint serum albumin, 0,05 % bovint gammaglobulin, pH 7,4)

2) 30 µL serumprov

3) 20 µL testbuffert (samma som i steg 1)

4) 20 µL kolpartikel-konjugat (anti-hIgE-antikropp adsorberad till kolpartiklar, 300 µg/mL, spädd i testbuffert)

5) 2 x 30 µL testbuffert



- 6) Detektionszonens kolsvärtning mättes som absorbans med Ultrosan XL, Enhanced Laser Densiometer (LKB).

### Resultat

#### 5 Proteinmängd i detektionszon

**Tabell 1** Deponerad mängd t3 i detektionszon

Deponeringslösning/ suspension	Mängd protein i reaktionszon per 0,5 cm remsa (ng)
t3-extrakt 1/14	410
t3-extrakt 1/28	205
t3-kopplade partiklar (4%)	226

#### 10 **Tabell 2**

Lateral immunkromatografi med dels direktadsorberat t3-extrakt och dels t3-kopplade partiklar i detektionszon.

Upptag av t3-positiva och negativa serum prover, haltbestämda med Pharmacia CAP system (Pharmacia & Upjohn

15 Diagnostics AB, Sverige).

Deponerings- lösning/ suspension	35534 (1,8 KU/L)	35696 (3,1 KU/L)	35711 (29,4 KU/L)	36429 (neg, <0,35 KU/L)
t3-extrakt 1/14	5*	6	3	0
t3 extrakt 1/28	5	0	0	0
4 % t3- kopplade partiklar	106	64	474	18

\* = absorbans (x1000) i reaktionszon efter att markören har bundit in.



### Slutsats

Försöken visar att samma mängd björkallergen deponerat i form av kopplade partiklar ger betydligt högre inbindning av björkspecifika IgE-antikroppar jämfört med när

5 allergenet deponeras direkt på membranet.

I liknande försök användes som förankringspartiklar olika monodispersa polystyrenpartiklar (Bangs Laboratories) och istället för kolpartiklar olika diametrar av fluorescenta polystyrenpartiklar. Diameterarna på förankringspartiklarna

10 varierade i olika försök i intervallet 0,28-3  $\mu\text{m}$ .

Diameterarna på märkörpartiklarna varierade i olika försök i intervallet 0,1-0,5  $\mu\text{m}$ . Resultaten följde i stort sett resultaten med kolpartiklar, som presenterats i detalj ovan.

15

**EXEMPLEL 2: BESTÄMNING AV BJÖRKSPECIFIKT IGE MED TESTVARIANT DÄR ALLERGENER FÖRDEPONERATS I APPLIKATIONSZONEN**

### Metoder och material

Biotinylering av björkpollenallergen: Extraktion av t3 (björkpollen, Betula verrucosa) utfördes som beskrivits tidigare med undantag av att den centrifugerade och filtrerade lösningen applicerades på PD-10-kolonn och eluerades ut i avjonat vatten. t3-eluatet frystorkades (LSL SECROID, LYOLAB F, pump: LEYBOLD TRIVAC D8B).

25 Frystorkat t3-material löstes upp i 0,15 M  $\text{KPO}_4$ , 0,15 M NaCl, pH 7,8. Haltbestämning gjordes med aminosyraanalys. Till materialet tillsattes  $^{125}\text{I}$ -inmärkt t3 och blandningen applicerades på PD-10 kolonn jämviktad med 25 mL 0,15 M  $\text{KPO}_4$ , 0,15 M NaCl, pH 7,8. Biotinylering av t3-allergen  
30 utfördes enligt rekommenderade betingelser från leverantör (Pierce). Till 3 mg eluerat t3-extrakt (2.0 mL) tillsattes sedan 0,138 mL biotin-LC-Sulfo-NHS (3,59 mM, Pierce), och man inkuberade på skak i 1 timme vid rumstemperatur. Kopplingsreaktionen avbröts genom tillsats av 50  $\mu\text{L}$  2 M  
35 glycin. Extraktet applicerades därefter på gelfiltreringskolonn PD-10 jämviktad med 50 mM  $\text{NaPO}_4$ , 0,15



30-12-1998

M NaCl, pH 7,4. Utbyten och final proteinkoncentration bestämdes utifrån erhållen radioaktivitet.

Koppling av Streptavidin till polystyrenpartiklar:

5 Streptavidin (Molecular Probes) kopplades kovalent till fenyl-dextran-adsorberade polystyrenpartiklar med CDAP (1-cyano-4-dimetylamino-pyridiniumbromid) (Kohn J and Wilchek M, FEBS Letters 154(1) (1983) 209-210).

10 Avsaltning och buffertbyte av streptavidin utfördes genom gelfiltrering (PD-10) i  $\text{NaHCO}_3$ , 0,1 M, pH 8,5. 600 mg fenyl-dextranbelagda polystyrenpartiklar i en 2% lösning i 30 vol% aceton aktiverades med 4,5 mL CDAP (0,44 M) och 3,6 mL TEA (0,2 M trietylamin, Riedel-deHaën). CDAP tillsattes under omrörning i 60 sek och TEA under 120 sek. Partiklarna 15 tvättades därefter med 30 vol% aceton och centrifugerades vid 12.100g (25 min, Beckman, J-21, JA-20, 10.000 rpm).

20,6 mg streptavidin kopplades till 350 mg aktiverade partiklar vid inkubering på skak i 1,5 timmar vid +4°C. Därefter centrifugerades partiklarna innan avaktivering 20 utfördes med glutaminsyra 0,05 M och asparbinsyra 0,05 M i  $\text{NaHCO}_3$ -buffert. Inkubering skedde under omrörning över natt vid +4°C. De kopplade partiklarna tvättades sedan två gånger med 50 mM  $\text{NaPO}_4$ , 0,05%  $\text{NaN}_3$ , pH 7,4.

Partikelkoncentrationen bestämdes spektrofotometriskt vid 25  $A_{600 \text{ nm}}$  med obehandlade partiklar som referens.

Deponering av streptavidinkopplade partiklar på

nitrocellulosa membran: På nitrocellulosa flak med polyesterbaksida (Whatman, 8  $\mu\text{m}$ , 5 cm bred) applicerades 30 zoner med Linear Striper (IVEK Corporation) av streptavidinkopplade partiklar spädda till 1 % partikelhalt i 10 mM  $\text{NaPO}_4$ , 5 % sukros, 5% dextran 5000, pH 7,4.

Deponeringsflödet var 2,5  $\mu\text{L}/\text{cm}$  och hastigheten 20 mm/sek. Deponeringarna torkades 1 timme vid 30°C, varefter flaken 35 klipptes till 0,5 cm breda remsor (Matrix 1201 Membrane Cutter, Kinematics Automation).





Deponering av biotinylerat allergen på filterpapper:

Filter 10x5 mm klipptes ut från filterpapper (Whatman 3).  
10 µL Biotinylerat t3 (77 ng) i 50 mM fosfatbuffert, pH  
7.4, BSA 6%, dispenserades till filtren, och filtren  
5 torkades vid 30°C i 45 minuter.

Koppling av anti-hIgE-antikroppar till

detektionspartiklar: Antikroppar mot hIgE klyvda med pepsin  
till fab'2-fragment kopplades till fluorescenta  
polystyrenpartiklar med aldehydgrupper på ytan (Molecular  
10 Probes C-17177 TransFluoSpheres, aldehyde-sulfate  
microspheres, 0,1 µm, 633/720, 2 % solids). 23 mg antikropp  
kopplades till 66 mg partiklar i 50 mM NaPO<sub>4</sub> buffert pH 6,5  
över natt i rumstemperatur. Därefter tillsattes 205 µL  
NaCNBH<sub>4</sub> (5 M) för att reducera kopplingen under 3 timmar i  
15 rumstemperatur. Centrifugering utfördes vid 20.800 x g (50  
min i Eppendorf 5417R, 14.000 rpm), varefter man  
avaktiverade i glutaminsyra 0,05 M och asparaginsyra 0,05 M  
i avjoniserat vatten pH 6,5 över natt under omrörning i  
rumstemperatur. Därefter centrifugerade man vid 20.800 x g  
20 (50 min). Efter blockering med 0,2 % BSA i 50 mM NaPO<sub>4</sub> pH  
7,4 med 0,05 % NaN<sub>3</sub> och inkubering över natt vid +4°C  
centrifugering man åter vid 20.800 x g (50 min). Man  
tvättade sedan två gånger med och förvarade i  
blockeringsbuffert. Partikelkoncentration bestämdes i  
25 fluorimeter (Perkin-Elmer LS50B) med standardkurva gjord av  
ursprungspartikeln. Kopplad proteinkoncentration bestämdes  
genom att ha radioaktivt anti-hIgE närvarande vid  
kopplingen.

30 Testförfarande: Remsor monterades på en yta som lutade ca  
16° från bänkplanet. Sugande membran (3,4 cm bred,  
Schleicher & Schuell, GB004) placerades 0,5 cm in på  
remsans övre kant. För konstant tryck lades metalltyngder  
på de sugande membranerna. Prover och reagens pipetterades i  
35 ordning enligt nedan. Varje prov och reagensvolym fick suga  
in i membranet innan nästföljande volym pipetterades.



- 1) Förtvätt med 30 µL 50 mM NaPO<sub>4</sub>, 0,15 M NaCl, pH 7,4.
- 2) Filter med fördeponerat biotinylerat t3 placerades  
längst ned på remsan.
- 3) 30 µL serum pipetterades till varje filter.
- 5 4) 20 µL testbuffert (0,1 M NaPO<sub>4</sub>, 0,15 M NaCl, 10 % sukros,  
3 % BSA, 0,05 % bovint gammaglobulin, 0,05 % NaN<sub>3</sub>, pH  
7,4) tillsattes filtret.
- 5) Allergenfiltret avlägsnades.
- 6) 20 µL detektionskonjugat (75 µg/mL) spätt i testbuffert.
- 10 7) 2 x 30 µL testbuffert.
- 8) Detektionszonens fluorescens mättes som responsyta (Vmm)  
med scannande röd laser-fluorometer (635 nm).  
Valda serumprover inkluderade negativa, svagt positiva  
och ett högt positivt serum.

15

**Resultat**

Prov	IgE konc. (KU/L)	Grupp	Respons yta (Vmm)
35517	0,7	svagt-pos	0,083
35713	0,8	svagt-pos	0,037
35803	0,9	svagt-pos	0,361
35805	1,1	svagt-pos	0,166
37692	neg	neg	0,001
35592	neg	neg	0,096
35593	neg	neg	0,006
35599	neg	neg	0,002
35716	54	pos	2,507

- Resultaten visar att principen med fördeponerade  
20 allergener (eller antigener) i appliceringszon och med en  
generell bindare i reaktionszon fungerar väl.



## PATENTKRAV

1. Sätt vid analysmetoder i en flödesmatris, vilka metoder  
5 utnyttjar biospecifika affinitetsreaktioner för att  
påvisa en analyt i ett prov, och innebär att
  - i. man låter provet (analyten) och en analytiskt  
detekterbar reaktant (Reaktant\*) vandra genom  
10 flödeskanaler i en flödesmatris till en i  
matrisen belägen detektionszon (DZ), i vilken  
det finns en fast förankrad biospecifik affini-  
tetsreaktant (Fångare), varvid
  - 15 ii. Reaktant\* fångas upp i detektionszonen (DZ) i  
en mängd, som är relaterad till mängden analyt  
i provet,  
**kännetecknat** av att
    - A) Reaktant\* har partiklar som analytiskt detekter-  
bar grupp, och
    - 20 B) Fångaren är förankrad till matrisen via immobili-  
serade partiklar, som företrädesvis uppvisar hyd-  
rofila grupper på sin yta.
2. Sätt enligt krav 1, **kännetecknat** av att flödet sker la-  
25 teralt i matrisen.
3. Sätt enligt krav 1 eller 2, **kännetecknat** av att ka-  
pillärkrafter driver flödet.
4. Sätt enligt något av kraven 1 till 3, **kännetecknat** av  
30 att Fångaren har förmåga att via biospecifik affinitet  
binda en reaktant som i sin tur binder analyt  
biospecifikt.
5. Sätt enligt krav 4, **kännetecknat** av att nämnda reaktant  
35 tillsätts med provet eller är fördeponerad i matrisen  
uppströms detektionszonen (DZ) så att reaktanten kan  
reagera med analyt innan den når detektionszonen (DZ).



- 5
6. Sätt enligt något av kraven 1-5, **kännetecknat** av att partiklarna som förankrar Fångaren har en storlek som är mindre än minsta innermått i matrisens flödeskanaler.
- 10
7. Sätt enligt något av kraven 1-6, **kännetecknat** av att partiklarna, som förankrar Fångaren, har en storlek som är i intervallet 0,1-1000  $\mu\text{m}$ , med företräde för intervallet 0,1-100  $\mu\text{m}$ .
- 15
8. Sätt enligt något av kraven 1-7, **kännetecknat** av att markörpartiklarna har diametrar i intervallet 0,01-5  $\mu\text{m}$ .
- 20
9. Sätt enligt något av kraven 1-8, **kännetecknat** av att flödeskanalerna har minsta innermått i intervallet 0,4-1000  $\mu\text{m}$ , med företräde för 0,4-100  $\mu\text{m}$ .
- 25
10. Sätt enligt något av kraven 1-9, **kännetecknat** av att markörpartiklarna är fluorescenta eller färgade.
- 30
11. Sätt enligt något av kraven 1-10, **kännetecknat** av att Reaktant\* är fördeponerad i matrisen uppströms detektionszonen (DZ), och företrädesvis uppströms provappliceringssättet.
- 35
12. Sätt enligt något av kraven 1-11, **kännetecknat** av att partiklarna, som förankrar Fångaren till matrisen, är en syntetisk polymer eller en semisyntetisk polymer eller en biopolymer och uppvisar hydrofila grupper på sin yta.
13. Sätt enligt något av kraven 1-12, **kännetecknat** av att bestämningsmetoden är av sandwich-typ, i vilken Reaktant\* fångas upp i detektionszonen (DZ) genom bildning av det ternära komplexet Reaktant'---analyt---Reaktant\*, där Reaktant' och Reaktant\* har förmåga att





30-12-1998

samtidigt binda analyt biospecifikt och Reaktant' är den fast förankrade Fångaren eller en reaktant som Fångaren kan binda till via biospecifik affinitet.

- 5 14. Sätt enligt krav 13, **kännetecknat** av att analyten är en antikropp med specificitet för endera Reaktant' eller Reaktant\*, och att
- 10 a) Reaktant' är ett antigen/hapten och Reaktant\* är en antikropp riktad mot en konstant antikroppsregion på analyten, när analytens antikroppsspecificitet är riktad mot Reaktant', eller
- 15 b) Reaktant\* är ett antigen/hapten och Reaktant' är en antikropp riktad mot en konstant antikroppsregion på analyten, när analytens antikroppsspecificitet är riktad mot Reaktant\*.
- 20 15. Sätt enligt krav 13, **kännetecknat** av att analyten är ett antigen och Reaktant' och Reaktant\* är antikroppar med specificitet för epitoper på analyten.
- 25 16. Sätt enligt något av kraven 13-14, **kännetecknat** av att analyten är av IgE-klass riktad mot ett allergen.
- 30 17. Sätt enligt något av kraven 1-16, **kännetecknat** av att bestämningsmetoden utförs i samband med diagnosticering av allergi eller autoimmun sjukdom.
- 35 18. Testkit för utförande av analysmetoder som utnyttjar biospecifika affinitetsreaktioner för att påvisa en analyt i ett prov, vilket innefattar (i) en flödesmatris med en detektionszon (DZ), i vilken det finns en fast förankrad biospecifik affinitetsreaktant (Fångare), och (ii) en analytiskt detekterbar reaktant (Reaktant\*), **kännetecknat** av att
- A) Reaktant\* har partiklar som analytiskt detekterbar grupp, och



B) Fångaren är förankrad till matrisen via immobiliserade partiklar, som företrädesvis uppvisar hydrofila grupper på sin yta.

- 5    19. Kit enligt krav 18, **kännetecknat** av att matrisen är en  
latéral flödesmatris.
- 10    20. Kit enligt krav 18 eller 19, **kännetecknat** av att  
matrisen är sådan att kapillärkrafter driver flödet i  
matrisen.
- 15    21. Kit enligt något av kraven 18 till 20, **kännetecknat** av  
att Fångaren har förmåga att via biospecifik affinitet  
binda en reaktant som i sin tur binder analyt  
biospecifikt.
- 20    22. Kit enligt krav 21, **kännetecknat** av att nämnda reaktant  
tillsätts med provet eller är fördeponerad i matrisen  
uppströms detektionszonen (DZ) så att reaktanten kan  
reagera med analyt innan den når detektionszonen (DZ).
- 25    23. Kit enligt något av kraven 18-22, **kännetecknat** av att  
partiklarna som förankrar Fångaren har en storlek som  
är mindre än minsta innermått i matrisens  
flödeskanaler.
- 30    24. Kit enligt något av kraven 18-23, **kännetecknat** av att  
partiklarna, som förankrar Fångaren, har en storlek som  
är i intervallet 0,1-1000  $\mu\text{m}$ , med företräde för  
intervallet 0,1-100  $\mu\text{m}$ .
- 35    25. Kit enligt något av kraven 18-24, **kännetecknat** av att  
markörpartiklarna har diametrar i intervallet 0,01-5  
 $\mu\text{m}$ .



26. Kit enligt något av kraven 18-25, **kännetecknat** av att flödeskanalerna har minsta innermått i intervallet 0,4-1000  $\mu\text{m}$ , med företräde för 0,4-100  $\mu\text{m}$ .
- 5 27. Kit enligt något av kraven 18-26, **kännetecknat** av att markörpartiklarna är fluorescenta eller färgade.
- 10 28. Kit enligt något av kraven 18-27, **kännetecknat** av att Reaktant\* är fördeponerad i matrisen uppströms detektionszonen (DZ), och företrädesvis uppströms provappliceringssättet.
- 15 29. Kit enligt något av kraven 18-28, **kännetecknat** av att partiklarna, som förankrar Fångaren till matrisen, är en syntetisk polymer eller en semisyntetisk polymer eller en biopolymer och uppvisar hydrofila grupper på sin yta.
- 20 30. Kit enligt något av kraven 18-29, **kännetecknat** av att kitet är avsett för en bestämningsmetod av sandwich-typ, i vilken Reaktant\* fångas upp i detektionszonen (DZ) genom bildning av det ternära komplexet Reaktant'--analyt---Reaktant\*, där Reaktant' och Reaktant\* har förmåga att samtidigt binda analyt biospecifikt och
- 25 Reaktant' är den fast förankrade Fångaren eller en reaktant som Fångaren kan binda till via biospecifik affinitet.
- 30 31. Kit enligt krav 30, **kännetecknat** av att analyten är en antikropp med specificitet för endera Reaktant' eller Reaktant\*, och att
- 35 a). Reaktant' är ett antigen/hapten och Reaktant\* är en antikropp riktad mot en konstant antikroppsregion på analyten, när analytens antikroppsspecificitet är riktad mot Reaktant', eller
- b) Reaktant\* är ett antigen/hapten och Reaktant' är en antikropp riktad mot en konstant antikroppsregion på



analyten, när analytens antikroppsspecificitet är riktad mot Reaktant\*.

- 5           32. Kit enligt krav 30, **kännetecknat** av att analyten är ett antigen och Reaktant' och Reaktant\* är antikroppar med specificitet för epitoper på analyten.
- 10           33. Kit enligt krav 30 eller 31, **kännetecknat** av att analyten är av IgE-klass riktad mot ett allergen.
- 15           34. Kit enligt något av kraven 18-33, **kännetecknat** av att bestämningsmetoden utförs i samband med diagnosticering av allergi eller autoimmun sjukdom.





30-12-1998

## SAMMANDRAG

- Ett sätt vid och ett kit för analysmetoder i en flödesmatris, vilka metoder utnyttjar biospecifika
- 5     affinitetsreaktioner för att påvisa en analyt i ett prov. Sättet resp. kitet baseras på att man låter provet (analyten) och en analytiskt detekterbar reaktant (Reaktant\*) vandra genom flödeskanaler i en flödesmatris till en i matrisen belägen detektionszon (DZ), i vilken det
- 10     finns en fast förankrad biospecifik affinitetsreaktant (Fångare), varvid Reaktant\* fångas upp i detektionszonen (DZ) i en mängd, som är relaterad till mängden analyt i provet. Sättet och kitet kännetecknas av att
- 15     A) Reaktant\* har partiklar som analytiskt detekterbar grupp, och
- B) Fångaren är förankrad till matrisen via immobiliserade partiklar som företrädesvis är mindre än minsta innermätt i flödeskanalerna och som helst uppvisar hydrofila grupper på sin yta.

